

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado: **BIOMEDICINA**

Título de la tesis:

EFFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA SOBRE LA ENDOTOXEMIA Y LOS NIVELES DE LOS PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO Y EN PERSONAS DE EDAD AVANZADA

EFFECT OF DIETARY FAT ON ENDOTOXEMIA AND ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS LEVELS IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME AND ELDERLY PEOPLE

Director/Directores:

Pablo Pérez Martínez

Elena M. Yubero Serrano

Antonio Camargo Garcia

Autor de la tesis: **Javier López Moreno**

Fecha de depósito tesis en el Idep: **12/07/2018**

TITULO: *EFEECTO DE LA GRASA DE LA DIETA SOBRE LA ENDOTOXEMIA Y
LOS NIVELES DE LOS PRODUCTOS FINALES DE GLICACION
AVANZADA EN PACIENTES CON SÍNDROME METABOLICO Y EN
PERSONAS DE EDAD AVANZADA*

AUTOR: *Javier López Moreno*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA SOBRE LA ENDOTOXEMIA Y LOS NIVELES DE LOS PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO Y EN PERSONAS DE EDAD AVANZADA

DOCTORANDO/A: JAVIER LOPEZ MORENO

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El alumno del doctorado Javier López Moreno ha desarrollado el plan de investigación y de formación de manera adecuada. Los objetivos inicialmente planteados para el trabajo de doctorado se han desarrollado íntegramente, evaluando el efecto del consumo a largo plazo de cuatro modelos de dieta con diferente cantidad y tipo de grasa, tanto en ayunas como durante la fase postprandial, en los niveles de LPS y LBP, así como su influencia en los niveles endógenos de AGEs, en dos poblaciones diferentes: 1.) Una población con síndrome metabólico, perteneciente al Proyecto Europeo LIPGENE, y 2) en una población de edad avanzada (> 65 años).

En relación a la actividad investigadora derivada del proyecto de tesis, destacar el alumno ha publicado un total de 5 artículos científicos como primer firmante derivados de dicho proyecto (4 en primer Decil y 1 en primer Cuartil de su categoría), en las revistas indexadas mediante JCR, *Journal of American Geriatric and Society* (J Am Geriatr Soc. 2016 Apr;64(4):901-4. doi: 10.1111/jgs.114062), *Journal of Gerontology Biological Sciences* (J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2018, Mar 2;73(3):340-346. doi: 10.1093/gerona/glw214); *Molecular Nutrition and Food Research* (Mol Nutr Food Res. 2017 Feb 24. doi: 10.1002/mnfr.201601029); *Experimental Gerontology* (Exp Gerontol. 2017 Nov 10. pii: S0531-5565(17)30652-6. doi: 10.1016) y *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (J Agric Food Chem. 2017 Sep 6;65(35):7756-7763. doi: 10.1021).

El doctorando ha completado satisfactoriamente las diferentes actividades propuestas en el plan de formación, incluyendo la asistencia y participación en las Jornadas de Jóvenes Investigadores organizadas por el IMIBIC; asistencia a diversos cursos de formación

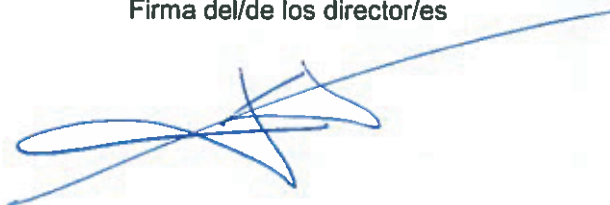
relacionados con su área de investigación así como a diferentes congresos regionales y nacionales e internacionales.

Todas las actividades se han justificado debidamente con documentos acreditativos.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 19 de Julio de 2018

Firma del/de los director/es



Fdo.: PABLO PEREZ MARTINEZ



Fdo.: ELENA M YUBERO SERRANO



Fdo.: ANTONIO CAMARGO GARCIA

Índice

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	15
Introducción	15
Hipótesis	15
Objetivos	16
Sujetos, diseño y metodología.....	16
Resultados	17
Conclusiones	18
II. INTRODUCCIÓN.....	21
1. SÍNDROME METABÓLICO	21
1.1. Antecedentes históricos	21
1.2. Definición actual del Síndrome Metabólico.....	23
1.3. Epidemiología. Prevalencia del Síndrome Metabólico.	24
2. SÍNDROME METABOLICO E INFLAMACIÓN.....	25
2.1. Concepto de inflamación.....	25
2.2. Respuesta inflamatoria	26
2.3. NF-kB.....	26
2.4. Citoquinas pro-inflamatorias	27
2.5. IL-1 β	27
2.6. TNF- α	28
2.7. IL-6.....	29
2.8. MCP-1	29
2.9. MIF-1	30
2.10. MMPs	30
2.11. Adipoquinas	31
2.12. Alteraciones metabólicas del síndrome metabólico y su relación con la inflamación.....	33
3. SÍNDROME METABOLICO Y ESTRÉS OXIDATIVO	40
3.1. Especies reactivas de oxígeno	40
3.2. NADPH oxidasa	41
3.3. Sistema de defensa antioxidante.....	41
3.4. Patologías asociadas al estrés oxidativo.....	44

3.5. Estrés oxidativo y envejecimiento.....	45
4. COENZIMA Q ₁₀	47
5. PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA.....	48
5.1. Formación de los AGEs. Mecanismos de acción	48
5.2. Receptores de los AGEs	51
5.3. AGEs y patologías asociadas	56
6. ENDOTOXEMIA	59
6.1. LPS (Lipopolisacárido)	59
6.2. LPS como endotoxina	60
6.3. LPS como molécula de adhesión bacteriana	61
6.4. LBP (Proteína de unión a LPS)	62
7. ESTADO POSTPRANDIAL	62
7.1. Respuesta postprandial, inflamación y Síndrome Metabólico	63
8. PAPEL DE LA DIETA EN EL SÍNDROME METABOLICO Y EN EL PROCESO DEL ENVEJECIMIENTO	65
8.1. Dieta e inflamación	65
8.2. Dieta y estrés oxidativo	67
8.3. Dieta y endotoxemia.....	68
8.4. Dieta y AGEs	69
8.5. Dieta Mediterránea	70
III. HIPÓTESIS	75
IV. OBJETIVOS	79
Objetivo principal:.....	79
Objetivos secundarios	79
IV. PUBLICACIONES	81
1..... Dietary fat quantity and quality modifies advanced glycation end products metabolism in patients with metabolic syndrome.....	83
2..... Mediterranean diet reduces serum advanced glycation end products and increases antioxidant defenses in elderly adults: A randomized controlled trial.....	97
3..... Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 modulates the postprandial metabolism of advanced glycation end products in elderly men and women	103
4..... Effect of dietary lipids on endotoxemia influences postprandial inflammatory response	113
5. Endotoxemia is modulated by quantity and quality of dietary fat in older adults	123
VI. CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFÍA.....	139

ABREVIATURAS

Las abreviaturas más comúnmente utilizadas en el texto se detallan a continuación:

AACE: Asociación Americana de Endocrinología Clínica

ABCA1: Proteína ATP binding cassette A1

AGEs: Productos Finales de Glicación Avanzada

AHA: American Heart Association

ARE: Elemento de respuesta antioxidante

ARNm: ARN mensajero

CAT: Catalasa

CAV1: Caveolina 1

CHO-PUFA: Dieta baja en grasas y rica en carbohidratos complejos suplementada con α linolénico de origen vegetal

CML: Carboxi-metilisina

CoQ: Coenzima Q₁₀

DHA: Ácido Docosahexanoico

DMT1: Diabetes Mellitus Tipo 1

DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2

ECV: Enfermedad Cardiovascular

EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

EOx: Estrés Oxidativo

EPA: Ácido Eicosapentanoico

ER α : Receptor de Estrógenos alfa

ERN: Especies Reactivas del Nitrógeno

EROs: Especies Reactivas del Oxígeno

Glox I: Glioxalasa I

GLUT-4: Transportador de glucosa sensible a la insulina

GPx: Glutation peroxidasa

GSH: Glutation reducido

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HMGB1: Proteína 1 de grupo de alta movilidad

HTA: Hipertensión Arterial

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

IDF: Federación Internacional de Diabetes

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IKB: Inhibidores del factor Kappa B

IKK β : Inhibidores de la subunidad β del factor nuclear Kappa B

IKK γ : Inhibidores de la subunidad γ del factor nuclear Kappa B

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-12: Interleucina 12

IMC: Índice de Masa Corporal

IRAK M: Kinasa 4 asociada al receptor de IL-1

IRH: Hiperemia isquémica reactiva

ISR1: Proteína sustrato del receptor de insulina 1

KDO: Ácido 3 desoxi D macrooctulosónico

LBP: Proteína de unión al Lipopolisacárido

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LFHCC: Dieta baja en grasa rica en carbohidratos complejos

LPS: Lipopolisacárido

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos

MG: Metilglioxal

MIF: Factor inhibidor de la migración de macrófagos

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

MMP-9: Metaloproteinasa 9

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

NADPH: Dinucleótido de nicotinamida adenina dinucleótido

NAMPT: Nicotinamida fosforibosiltransferasa

NCEP-ATP III: Tercer Informe del panel de expertos del Programa de Educación Nacional sobre Colesterol

NEFAs: Ácidos grasos no esterificados

NFKB: Factor de Transcripción Nuclear Kappa B

NHANES III: Tercera Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición

NHLBI: National Heart Lung and Blood Institute

NIK: Kinasa inductora de NFKB

NK: Células Natural Killer

Nrf2: Factor nuclear derivado de eritroides 2

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: Óxido nítrico

ONNO: Peroxinitrito

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno 1

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PCR: Proteína C Reactiva

PPAR γ : Receptor gamma activado del peroxisoma

PREDIMED: PREvención con Dieta MEDiterránea

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

RP105: Proteína radioprotector 105

SCARB2: Receptor scavenger clase tipo 2

SFA: Ácidos grasos saturados

Sirt I: Sirtuina I

SMet: Síndrome metabólico

SOD: Superóxido dismutasa

ST2L: Análogo del receptor de IL-1

TG: Triglicéridos

TIRAF1 TIRAF4: Factor 1/4 asociado al receptor del TNF α

TIR: Toll de interleucina 1

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

Trx: Tiorredoxina

TrxR: Tiorredoxina reductasa

VCAM: Proteína de adhesión de células vasculares

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

WHICAP: Proyecto de Envejecimiento Comunitario Washington Heights – Inwood

XBP1: Proteína de unión Xbox 1

XOX: Xantina oxidasa

RESUMEN

RESUMEN

Introducción

El síndrome metabólico (SMet) es un estado fisiopatológico multifactorial que aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) y diabetes mellitus tipo2 (DMT2), y que se caracteriza por la presencia de resistencia a la insulina, una alteración del metabolismo hidrocarbonado y lipídico, hipertensión arterial y obesidad. Su patogenia se asocia a diferentes procesos crónicos como el estrés oxidativo (EOx) e inflamación. Se considera una enfermedad postprandial, ya que los pacientes presentan un exagerado aumento de los niveles plasmáticos de triglicéridos postprandiales, así como anormalidades en el metabolismo postprandial de las lipoproteínas. Estudios en modelos animales han demostrado que la absorción de grasa a nivel intestinal, promueve la absorción de endotoxinas bacterianas, como es el caso del lipopolisacárido (LPS), un componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que pueden ser parcialmente responsables o potenciar la respuesta inflamatoria postprandial de diferentes patologías como es el caso del SMet. Por otro lado, se ha descrito el posible papel de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) en el desarrollo del SMet. Los AGEs constituyen un grupo heterogéneo de glicotoxinas citotóxicas pro-oxidantes que se acumulan gradualmente durante el envejecimiento, especialmente en el contexto de enfermedades crónicas. Los AGEs también se incorporan de manera exógena a través de la dieta contribuyendo al total de AGEs de un organismo.

La dieta, y en particular su contenido en grasa, pueden modular la respuesta inflamatoria y reducir los niveles de EOx. Diferentes resultados de nuestro grupo de investigación demuestran que el consumo de una dieta rica en grasa monoinsaturada (MUFA), como es el caso de una dieta Mediterránea, en comparación con dietas ricas en grasa saturada (SFA), reduce la activación de la respuesta inflamatoria postprandial y del EOx en pacientes con SMet y en sujetos sanos de edad avanzada.

Hipótesis

Nuestra hipótesis de estudio es demostrar que la disminución de la respuesta inflamatoria postprandial observada tras el consumo de una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados, en comparación con una dieta rica en ácidos grasos saturados o una dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono complejos, podría ser causada por una menor acumulación endógena de productos finales de glicación avanzada, y/o por una menor absorción intestinal de endotoxinas bacterianas (lipopolisacárido, LPS), promoviendo una reducción del estado pro-inflamatorio y del estrés oxidativo.

Objetivos

Determinar el efecto del consumo a largo plazo de diferentes modelos de dieta con distinta cantidad y tipo de grasa, tanto en ayunas como en estado postprandial, en los niveles de los productos finales de glicación avanzada así como en los niveles del lipopolisacárido (LPS) y de la proteína de unión a LPS (LBP), en la patología del síndrome metabólico y en el desarrollo del envejecimiento, y su relación como condicionante del estrés oxidativo y de la respuesta inflamatoria.

Sujetos, diseño y metodología

La presente Tesis se llevó a cabo en el marco de dos estudios diferentes de intervención dietética:

A. Estudio LIPGENE (NCT00429195), proyecto multicéntrico y europeo en pacientes con SMet, donde 75 de estos pacientes, correspondientes a la cohorte española, fueron aleatorizados para recibir una de las siguientes cuatro dietas isocalóricas durante un periodo de 12 semanas cada una: una dieta rica en SFA, una dieta rica en MUFA y dos dietas bajas en grasa y ricas en hidratos de carbono, suplementada o no con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3. Tras este periodo dietético, se realizó una sobrecarga grasa con el mismo tipo de grasa del periodo dietético que habían finalizado. En este estudio se evaluó el contenido de AGEs consumido a través de cada uno de los modelos de dieta, se determinó los niveles séricos de dichas glicotoxinas [metilglioxal (MG) y carboxi-metilisina (CML)] y la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los mismos [receptores de AGEs, (*AGER1* y *RAGE*), y los genes glioxalasa I (*Glox1*) y Sirtuina 1 (*Sirt1*)] (**Artículo 1**). Igualmente se evaluaron los niveles plasmáticos de LPS, y de LBP tanto en el basal, a las 12 semanas de cada una de las dietas y a las 4 horas de la sobrecarga grasa (**Artículo 4**).

B. Estudio de intervención dietética en 20 personas sanas, mayores de 65 años, que fueron asignados al azar para recibir, en un diseño cruzado, cuatro dietas isocalóricas: una dieta Mediterránea, rica en aceite de oliva virgen (MUFA), con o sin suplementar con CoQ, una dieta occidental, rica en SFA y una dieta baja en grasas, rica en hidratos de carbono enriquecida con PUFA n-3, durante un período de unas 4 semanas cada una. Tras este periodo dietético, se realizó una sobrecarga grasa con el mismo tipo de grasa del periodo dietético que habían finalizado. Se estudió el efecto del tipo de grasa de la dieta (dieta Mediterránea, dieta rica en SFA y dieta baja en grasas, rica en hidratos de carbono y enriquecida en PUFA n-3) sobre los niveles de AGEs y el metabolismo de los mismos (**Artículo 2**), y si el aporte exógeno de CoQ tendría un efecto potenciador, por lo que estudiamos el efecto de la dieta Mediterránea suplementada en CoQ, la dieta Mediterránea sin suplementar y la dieta rica en SFA (**Artículo**

3). Además, analizamos si el tipo de grasa y cantidad de la misma en la dieta modulaba los niveles plasmáticos de LPS, y los niveles de LBP (**Artículo 5**). En todos los casos se usó la misma metodología y determinaciones utilizadas en el estudio LIPGENE.

Resultados

- **Artículo 1:** Se observó una reducción de los niveles séricos de MG y CML tras el consumo de una dieta rica en MUFA, en comparación con la dieta rica en SFA, con un efecto intermedio tras el consumo de la dieta bajas en grasa y ricas en hidratos de carbono, suplementada o no con PUFA n-3, tanto en ayunas como en el postprandio ($p < 0.05$). Igualmente, el consumo de la dieta rica en MUFA produjo un aumento en la expresión de los genes *AGER1*, *Glox1* y *Sirt1* (relacionados con la destoxificación de AGEs y reducción del EOX) y una disminución de la expresión del gen *RAGE* (relacionado con el inicio de la respuesta inflamatoria), en comparación con las demás dietas ($p < 0.05$). Análisis de correlación mostraron que los niveles de MG y de CML se asociaban positivamente con la expresión de genes y parámetros relacionados con EOX e inflamación (*RAGE*, 8-hidroxi-deoxi-guanosina, LDL oxidada) y de manera negativa con la expresión de genes y parámetros relacionados con la defensa antioxidante (*Glox1*, glutatión peroxidasa y tioredoxina).

- **Artículo 2:** En una población sana de edad avanzada, el consumo de una dieta Mediterránea produjo una disminución de los niveles de MG y CML y de la expresión de *RAGE*, y un aumento de la expresión de *AGER1* y *Glox1*, en comparación con una dieta rica en SFA, con un efecto intermedio para la dieta rica en hidratos de carbono y enriquecida en PUFA n-3, tanto en ayunas como a nivel postprandial ($p < 0.05$). Análisis de regresión lineal múltiple mostraron una asociación independiente entre parámetros relacionados con EOX e inflamación y los niveles séricos de MG y CML y la expresión de *AGER1*.

- **Artículo 3:** La adición de CoQ a la dieta Mediterránea produjo una reducción de los niveles séricos de MG y CML y un aumento de la expresión de *AGER1* y *Glox1* durante el postprandio, en comparación con la dieta Mediterránea sin suplementar, en una población sana de edad avanzada ($p < 0.05$). Estudios de correlación mostraron que la expresión génica de *AGER1* se asociaba, de manera negativa, con la expresión de genes y parámetros relacionados con EOX e inflamación (8-isoprostanos y proteínas carboniladas) y de manera positiva con parámetros relacionados con la defensa antioxidante (*Nrf2*, óxido nítrico, tioredoxina), mientras que la expresión génica de *RAGE* se correlacionó, manera positiva, con la expresión de genes y parámetros relacionados con EOX e inflamación (8-isoprostanos o niveles séricos de MG).

- **Artículo 4:** El consumo de la dieta rica en SFA produjo un aumento postprandial de los niveles plasmáticos de LPS en comparación con las demás dietas en pacientes con SMet ($p < 0.05$). Además se demostró una asociación positiva entre los niveles postprandiales de LPS y los

niveles plasmáticos de la forma soluble de P-selectina y de VCAM-1 y de la expresión génica de IkB α , Nrf2, PPAR γ y MIF1, y una asociación negativa con expresión génica de NFkB ($p < 0.05$).

- **Artículo 5:** El consumo de una dieta rica en hidratos de carbono y enriquecida en PUFA n-3 redujo los niveles plasmáticos de LPS y LBP en ayunas en comparación con las dietas una población sana de edad avanzada ($p < 0.05$). Los niveles de LPS, en ayunas, se correlacionaron de manera positiva con la expresión génica de IkB α y MCP1 así como con los niveles plasmáticos postprandiales de LPS (todos los valores de $p < 0.05$). Los niveles plasmáticos de LBP, en ayunas, se correlacionaron de manera positiva con los niveles plasmáticos de MCP1 ($p < 0.05$).

Conclusiones

El consumo de una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados, en comparación con una dieta rica en ácidos grasos saturados o una dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono complejos con o sin suplementar con ácidos grasos poliinsaturados n-3, produce una menor acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) y una menor absorción intestinal de endotoxinas bacterianas (LPS), reduciendo así el estado pro-inflamatorio postprandial y el estrés oxidativo en pacientes con síndrome metabólico y en población sana de edad avanzada.

I. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. SÍNDROME METABÓLICO

1.1. Antecedentes históricos

El síndrome metabólico (SMet) es un estado fisiopatológico multifactorial que se ha convertido en uno de los principales problemas de salud del siglo XXI. Una de las primeras referencias en la literatura del SMet data de hace más de 250 años cuando, al basarse en las necropsias de individuos con patología cardiovascular, se describió la asociación entre obesidad abdominal, hiperuricemia, hipertensión arterial (HTA) y apnea del sueño¹. Más tarde, en 1923 Kylin señaló la asociación entre HTA, hiperuricemia y gota². Marañón en 1927, apuntó la existencia de alguna forma de predisposición de carácter general para la asociación entre la diabetes, HTA y la obesidad³. Después, en 1947, Vague postuló que la obesidad corporal se asociaba a determinadas anomalías metabólicas que se observaban en la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y la enfermedad cardiovascular (ECV)⁴. En 1963, Reaven y cols describieron elevados niveles de glucosa en ayunas, intolerancia a la glucosa y mayores niveles de triglicéridos en sujetos no diabéticos que habían sufrido un infarto agudo de miocardio en comparación con sujetos controles⁵. En 1966, Camus denominó, a la asociación descrita por Kylin, trisíndrome metabólico⁶, mientras Avogaro y Crepaldi denominaron *síndrome plurimetabólico* a la confluencia de obesidad, HTA, hiperuricemia, enfermedad arterial coronaria y DMT2⁷. Sin embargo, fueron Mehnert y Kuhlmann en 1968 quienes, por primera vez, describieron la importancia de la influencia de factores ambientales en el desarrollo de esta patología, definiendo el *síndrome del bienestar*, haciendo referencia a la relación entre determinadas anomalías metabólicas y algunos hábitos nutricionales y de estilo de vida en habitantes de países desarrollados⁸. Por otro lado, Reaven integró dichos trastornos en el denominado *síndrome X*, donde la resistencia a la insulina constituía el principal factor o mecanismo fisiopatológico del mismo⁹. En 1991, De Fronzo y Ferrannini sugirieron que la resistencia a la insulina podría ser el denominador común de estas alteraciones y que una vez adquirida, en aquellos sujetos genéticamente predispuestos, se podrían desarrollar otras alteraciones de este síndrome¹⁰. Además, dichos autores sugirieron que la combinación de una dieta equilibrada junto con la práctica de ejercicio físico y la pérdida de peso podría disminuir la resistencia a la insulina. En base a dicha hipótesis, en 1992, Hafner y cols lo denominaron *síndrome de resistencia a la insulina* para subrayar el hecho de que esta podría preceder al conjunto de alteraciones metabólicas observadas¹¹.

Sin embargo, no fue hasta 1998, cuando la *Organización Mundial de la Salud*, introdujo el término *síndrome metabólico* como entidad diagnóstica con criterios clínicos establecidos, referidos a la congregación de factores que generan una alteración del metabolismo lipídico y de los hidratos de carbono, con mayor predisposición a desarrollar DMT2 y ECV¹² (**Tabla 1**).

Posteriormente, esta definición fue modificada por *el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR)* que introdujo el perímetro de cintura abdominal como criterio diagnóstico¹³. Dos años después, *el Tercer Informe del panel de expertos del Programa de Educación Nacional sobre Colesterol (NCEP-ATP III)*, estableció una definición que alcanzó gran popularidad debido a su sencillez en la cual sus componentes se podrían determinar fácilmente y de manera sistemática en la mayor parte de los contextos clínicos y de investigación, donde se precisaban 3 de los 5 criterios propuestos para cumplir el diagnóstico de SMet¹⁴. En este caso no se concedía a ninguno de ellos la condición de indispensable, si bien se reconocía a la obesidad abdominal como el criterio más relevante.

Tabla 1. Definiciones del síndrome metabólico propuestas por la OMS, el EGIR y el ATP-III¹⁵

OMS, 1999	EGIR, 1999	ATP-III, 2001
<p>Diabetes o alteración de la tolerancia a la glucosa o resistencia frente a la insulina</p> <p>Más dos o más de los factores siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Obesidad: IMC > 30 o CCC > 0,9 en varones o > 0,85 en las mujeres 2- Dislipemia: triglicéridos ≥ 150 mg/dl o cHDL < 35 mg/dl en los varones o < 39 mg/dl en las mujeres 3- Hipertensión arterial: presión arterial ≥ 140/90 mm Hg o tratamiento medicamentoso 4- Microalbuminuria: excreción de albúmina ≥ 20 µg/min 	<p>Resistencia a la insulina o hiperinsulinemia (únicamente a las personas no diabéticas)</p> <p>Más dos o más de los factores siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Obesidad central: PC ≥ 94 cm en los varones o ≥ 80 cm en las mujeres 2- Dislipemia: triglicéridos > 150 mg/dl o cHDL < 39 mg/dl en varones y mujeres 3- Hipertensión: presión arterial ≥ 140/90 mm Hg o tratamiento medicamentoso 4- Glucemia en ayunas ≥ 110 mg/dl 	<p>Tres o más de los factores siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Obesidad central: PC > 102 cm en los varones > 88 cm en las mujeres 2- Hipertrigliceridemia: triglicéridos ≥ 150 mg/dl 3- Disminución del cHDL: < 40 mg/dl en los varones o < 50 mg/dl en las mujeres 4- Hipertensión: presión arterial ≥ 130/85 mm Hg o tratamiento medicamentoso 5- Glucemia en ayunas ≥ 110 mg/dl

OMS: Organización Mundial de la Salud; EGIR: European Group for the Study of Insuline Resistance; ATP-III: Adult Treatment Panel III; IMC: índice de masa corporal; CCC: cociente entre el perímetro de la cintura y el perímetro de la cadera; PC: perímetro de cintura; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad

Sin embargo, esta última definición fue modificada posteriormente por asociaciones como la *Asociación Americana de Endocrinología Clínica (AACE)*¹⁶, y la *Federación Internacional de Diabetes (IDF)*¹⁷. La AACE recogió cuatro factores como «alteraciones identificativas» del SMet: elevación de la concentración de triglicéridos, disminución de la concentración de HDL,

incremento de la presión arterial y aumento de las concentraciones de glucosa, tanto en ayunas como después de la administración de glucosa y excluyó la obesidad como componente del SMet debido a que consideró que la obesidad central era un factor que contribuye a la aparición de resistencia a la insulina, más que una consecuencia de ésta. Por su parte, la IDF señaló la necesidad urgente de racionalizar la gran variedad de definiciones desarrolladas sobre el SMet, haciéndola válida tanto en la práctica clínica como en los ámbitos de investigación¹⁸. Por todas estas razones, se constituyó un grupo de consenso formado por miembros de la IDF pertenecientes a todas las regiones geográficas y por representantes de distintas organizaciones profesionales, incluidas las que habían propuesto las definiciones previas, con el objetivo de establecer un nuevo grupo de criterios que identificaran a las personas que presentan SMet, definir mejor la naturaleza del síndrome e insistir en las estrategias de modificación del estilo de vida y terapéuticas para reducir el riesgo a largo plazo de ECV y DMT2¹⁵. Este objetivo dio lugar a una nueva definición donde la obesidad central representaba un requisito en el diagnóstico del SMet¹⁹, estableciéndose por primera vez valores umbral para definir la obesidad en los distintos grupos étnicos¹⁷⁻²⁰.

Finalmente, en 2005, la *American Heart Association* (AHA) y el *National Heart Lung and blood Institute* (NHLBI)²¹ recogen una clasificación del ATP III actualizada, donde no se considera obligatoria la obesidad abdominal en el diagnóstico de SMet y donde el valor umbral dependerá del origen étnico de la persona (**Tabla 2**).

Tabla 2. Actualización de la definición ATP-III¹⁵

La presencia de 3 de los 5 criterios que se recogen a continuación constituye un diagnóstico de síndrome metabólico

Valores umbral categóricos:

- Incremento del perímetro de la cintura^a: 102 cm en los varones y 88 cm en las mujeres
 - Elevación de los triglicéridos: 150 mg/dl (1,7 mmol/l), o tratamiento farmacológico por elevación de los triglicéridos^b
 - Disminución del cHDL: 40 mg/dl (0,9 mmol/l) en los varones, 50 mg/dl (1,1 mmol/l) en las mujeres, o tratamiento farmacológico para disminuir las concentraciones de cHDL^b
 - Elevación de la presión arterial: 130 mmHg la sistólica y 85 mmHg la diastólica, o bien tratamiento medicamentoso de la hipertensión
 - Elevación de la glucemia en ayunas: 100 mg/dl o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia
-

ATP-III: Adult Treatment Panel III; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

^aAlgunos adultos estadounidenses de origen no asiático (p. ej., personas de razas blanca o negra, y de origen hispano) con un incremento marginal del perímetro de la cintura (p. ej., 94-102 cm en los varones y 80-88 cm en las mujeres) pueden presentar una resistencia frente a la insulina con un componente genético importante; en estas personas se pueden conseguir efectos beneficiosos importantes a través de las modificaciones en los hábitos del estilo de vida, de la misma manera que en los varones que presentan incrementos categóricos en el perímetro de la cintura. En las personas de origen asiático-americano parece apropiada la disminución del valor umbral del perímetro de la cintura (p. ej., 90 cm en los varones y 80 cm en las mujeres).

^bLos fibratos y el ácido nicotínico son los fármacos utilizados con mayor frecuencia en los pacientes con elevación de los triglicéridos y con disminución de las concentraciones de cHDL. En los pacientes que toman cualquiera de estos fármacos se presupone la elevación de los triglicéridos y la disminución del cHDL.

1.2. Definición actual del Síndrome Metabólico

En la actualidad las definiciones más ampliamente empleadas en los trabajos publicados y los ensayos clínicos en desarrollo son, fundamentalmente la de la *ATP III* actualizada (AHA/NHLBI) y, en menor medida, la de la *IDF*. Los criterios del *NCEP-ATP III* actualizados

facilitan la realización de estudios epidemiológicos sobre el SMet al utilizar parámetros mucho más asequibles a la práctica clínica, y son los criterios más utilizados en los trabajos publicados en los últimos años. Por ello serán los que utilizaremos en el presente trabajo, diagnosticando a aquellos pacientes con SMet si cumplen o exceden tres o más de los criterios expuestos en la **Tabla 2**.

Destacar que aunque ninguna de las guías de diagnóstico lo incluye entre sus factores, actualmente se acepta que en el SMet existe un estado proinflamatorio, prooxidativo y protrombótico que interaccionan sinérgicamente, causando o acelerando el proceso de aterosclerosis. De esta manera, se considera que el SMet está asociado a un incremento de 4 a 5 veces la prevalencia de DMT2, y de 2 a 3 veces la de ECV ^{19,-}.

La etiología del SMet es en gran medida desconocida aunque se encuentra relacionada con factores genéticos, epigenéticos, metabólicos y ambientales entre los que destaca la dieta y sobre todo el tipo de grasa ingerida²².

1.3. Epidemiología. Prevalencia del Síndrome Metabólico.

La prevalencia del SMet depende de las definiciones utilizadas, así como de la población estudiada²³. Múltiples estudios han examinado la prevalencia del SMet utilizando diferentes criterios tales como el diseño del estudio, la edad, el sexo, el origen étnico, el medio ambiente de la población estudiada y la prevalencia de obesidad de la población de base, por lo que es difícil trabajar a partir de valores unificados²⁴. En general, la *IDF* estima que un cuarto de la población adulta del mundo tiene SMet. Un mayor nivel socioeconómico, un estilo de vida sedentario y un elevado índice de masa corporal (IMC) se asociaron significativamente con el SMet y, por esta razón, la prevalencia de este síndrome es alta y está en aumento en muchas sociedades occidentales²⁵. Cameron y *col.* concluyeron que las diferencias en los antecedentes genéticos, la dieta, los niveles de actividad física, el tabaquismo, los antecedentes familiares de diabetes y educación influyen la prevalencia del SMet y sus componentes²⁶.

En España, los datos existentes muestran resultados similares a los encontrados en estudios internacionales. Scholze y *col.* informaron que en España, el 22% de la población hipertensa tiene suficientes criterios para el diagnóstico del SMet y es probable que este porcentaje aumente constantemente. Además, se llegó a la conclusión de que todos los componentes del SMet son significativamente más prevalentes en los hombres, excepto los valores bajos de HDL, que es más prevalente en las mujeres.

La asociación entre SMet y la incidencia de ECV y DMT2 es evidente según los datos de un estudio prospectivo realizado en una cohorte de 1209 hombres caucasianos sanos (42-60 años). A lo largo del estudio, los individuos que desarrollaron varias de las alteraciones metabólicas presentes en el SMet, incrementaron el riesgo de ECV en más de 4 veces y duplicaron su

mortalidad²⁷. Estos factores de riesgo también están presentes en individuos no caucasianos, según muestra un estudio realizado en 808 hombres japoneses sin HTA, dislipemia o DMT2, donde tras un periodo de seguimiento de 6 años, la incidencia de ECV fue 2 veces superior en aquellos individuos que presentaron al menos 3 de las características presentes en el SMet, en comparación con los individuos sanos²⁸.

Por otro lado, el registro de la Tercera Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición (*NHANES III*) demostró que la prevalencia de SMet aumentaba de forma paralela a la edad y superaba el 40% en las personas mayores de 60 años. Además, los sujetos con SMet mostraron mayor prevalencia de cardiopatía isquémica que los diagnosticados de DMT2 pero que carecían de SMet (el 13,9 frente al 7,5%) pero menor que la de los que presentaban ambas patologías²⁹.

Otros datos relevantes han sido los aportados por los estudios Framingham y WOSCOPS que demostraron que el SMet es predictor del desarrollo de DMT2³⁰. Concretamente, el seguimiento durante 6 años de la cohorte del estudio WOSCOPS demostró que, en los sujetos con SMet, el riesgo de desarrollar DMT2 era casi 4 veces superior frente a los que no tenían SMet, especialmente en aquellos con niveles elevados de proteína C reactiva (PCR). Por otra parte, los pacientes con SMet mostraron más complicaciones cardiovasculares que los que no tenían SMet, independientemente de los niveles de PCR.

2. SINDROME METABOLICO E INFLAMACIÓN

La inflamación se ha relacionado en los últimos años con el desarrollo y la progresión de la obesidad, la DMT2, la ECV y en consecuencia, con el SMet.

2.1. Concepto de inflamación

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa del organismo contra las infecciones. Este sistema consta de barreras epiteliales y de células y proteínas circulantes que reconocen diferentes microorganismos o sustancias producidas durante la infección e inician la respuesta para eliminar dichos patógenos³¹. Algunas de estas células, principalmente macrófagos y linfocitos, desencadenan una serie de señales que darán lugar a una respuesta inflamatoria (reacción inicial de la inmunidad innata).

En la respuesta inflamatoria los leucocitos son atraídos hacia la zona de infección y se activan, teniendo como finalidad destruir los microorganismos patógenos al reclutar a las células efectoras activadas hacia los tejidos infectados. Los fenómenos de inflamación inducen cambios en el organismo, mediado por proteínas (tales como citoquinas), que aumentan la capacidad del sistema inmunitario innato para erradicar la infección. No obstante, si esta inflamación persiste, puede provocar una lesión tisular sistémica.

2.2. Respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria representa una reacción precoz e inespecífica pero también altamente compleja del organismo frente a una gran variedad de agresiones como son las infecciones bacterianas, víricas o parasitarias, los traumatismos térmicos o mecánicos, radicales libres (*estrés oxidativo*), la necrosis isquémica o el crecimiento neoplásico³². Dicha respuesta puede ser transitoria o aguda, o bien, puede persistir en el tiempo dando lugar a una respuesta inflamatoria crónica.

De este modo, ante una agresión se produce una reacción local con activación de macrófagos, monocitos y otras células productoras de citoquinas proinflamatorias. Mientras que la reacción local se manifiesta en forma de inflamación aguda (leucocitosis o trombocitosis), la respuesta sistémica conlleva una serie de alteraciones neurológicas, hematopoyéticas, metabólicas y hepáticas acompañadas de modificaciones en la síntesis de diversas proteínas plasmáticas³³. Tras una respuesta inflamatoria, se puede producir fiebre, alteraciones en la síntesis de diversas hormonas, un balance nitrogenado negativo o cambios en el perfil lipídico³⁴. Bone y cols, en el año 1996, identificó tres etapas en la respuesta inflamatoria³⁵:

- 1) Producción local de mediadores inflamatorios en respuesta a la agresión o a la infección que actuarían de forma autocrina o paracrina iniciando la respuesta inflamatoria local
- 2) Liberación de pequeñas cantidades de mediadores a la circulación que actúan de forma endocrina, con fines protectores
- 3) Reacción sistémica masiva determinada por el paso de gran cantidad de mediadores inflamatorios a la circulación determinando una actividad sostenida y generalizada de la cascada inflamatoria que puede comprometer la integridad de los órganos diana.

2.3. NF-kB

El factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB) es un factor de transcripción involucrado en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria, la apoptosis y la proliferación celular³⁶. Ante ciertos estímulos, como un incremento en los radicales libres, la radiación ultravioleta, infecciones víricas y bacterianas, moléculas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas o citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o la interleuquina 1 beta (IL1- β), NF-kB puede activarse y regular la expresión de diversas citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión celular, inmunorreceptores o enzimas inflamatorias, todas ellas implicadas en procesos de inflamación, arteriosclerosis o resistencia a la insulina³⁷. La activación de este factor está controlada por la familia de inhibidores del factor kappa B (I κ B), que se unen a los dímeros de NF-kB y evitan su translocación al núcleo³⁸. NF-kB puede ser activado mediante dos rutas: la clásica y la alternativa. En la ruta de activación clásica, la translocación al núcleo de NF-kB se inicia con la fosforilación de serinas en I κ B situadas en la región N terminal e involucra a las subunidades

del inhibidor de la subunidad β y γ del factor nuclear Kappa B (IKK β y IKK γ respectivamente)³⁹. La activación del complejo IKK da lugar a la fosforilación de los aminoácidos Ser-32 y Ser-36 en Ikb α y las Ser-19 y Ser-23 en el caso de Ikb β ⁴⁰. Una vez que los Ikb α están fosforilados, son reconocidos por el complejo β -TrCP-SCF (o el complejo ligasa ubiquitina E3) resultando en la ubiquitinización de Ikb α , su degradación por el proteosoma 26S y la translocación nuclear de NFkB⁴¹. En la ruta de activación alternativa se produce la activación de NF-kB mediante la (kinasa inductora de NF-kB (NIK) e IKK α . En respuesta a tales estímulos como la linfotóxina β , la NIK activa a la IKK α , induciéndose el procesamiento mediado por el proteosoma p100 con la translocación nuclear del dímero p52-Relb⁴². Se ha sugerido que dicha ruta tiene un papel fisiológico en las respuestas mediadas por las células B y la inmunidad humoral adaptativa⁴³.

2.4. Citoquinas pro-inflamatorias

Las citoquinas inician su acción uniéndose a receptores específicos en la célula diana⁴⁴, y regulan las respuestas inmunes e inflamatorias y son producidas por diferentes células⁴⁵. Son proteínas sintetizadas por la inmunidad innata y específica como respuesta a estímulos inflamatorios o antígenicos⁴⁶. Pueden actuar de forma autocrina, paracrina o endocrina, y sirven como factores de crecimiento para muchos tipos celulares⁴⁷. No obstante, su producción excesiva conduce a situaciones patológicas, de ahí su implicación en enfermedades inflamatorias, inmunes e infecciosas⁴⁸. Fundamentalmente son producidas por los linfocitos y los macrófagos activados, sin embargo también pueden ser sintetizadas por células polimorfonucleares, endoteliales y epiteliales, por adipocitos o por miocitos⁴⁹.

Las citoquinas actúan sobre diversos tipos celulares y sus acciones pueden ser redundantes. Además, poseen múltiples efectos sobre la misma célula diana e influyen en la síntesis y acción de otras citoquinas⁵⁰. En este apartado, nos centraremos en las citoquinas: IL1 β , TNF- α , interleucina 6 (IL-6), proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), y factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)⁵¹.

2.5. IL-1 β

La familia de las IL-1 está formada por 11 proteínas (de IL-1F a IL-11F) codificadas por 11 genes diferentes⁵². Los genes de la mayoría de los miembros de la superfamilia de la IL-1 están localizados en el cromosoma 2⁵³. La IL1 β es sintetizada principalmente por macrófagos activados como un precursor de 31 kDa que es procesado proteolíticamente en su forma activa por proteasas celulares específicas⁵⁴. Otras fuentes celulares incluyen neutrófilos, queratinocitos o células endoteliales.

La producción de la IL-1 puede estar inducida por el lipopolisacárido (LPS), diversas citoquinas como el TNF- α , la IL-2, la IL-3, la IL-12, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, el factor estimulante de colonias de macrófagos o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas⁵⁵. Otros inductores pueden ser el plasminógeno, la trombina, las moléculas de LDL oxidadas o la PCR⁵⁶. La IL-1 es un importante mediador de la respuesta inflamatoria, y está involucrada en diversas actividades celulares, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis⁵⁷.

La potente actividad de IL-1 β se limita a tres niveles principales: 1) la síntesis y la liberación, 2) los receptores de membrana y 3) la transducción de una señal intracelular⁵⁸. Esta vía de señalización incluye mecanismos positivos y negativos de retroalimentación que terminan por amplificar o inhibir la señal de esta citoquina⁵⁹. Al igual que el TNF- α , la IL-1 β favorece la síntesis de IL-6 y estimula la actividad ciclooxigenasa⁶⁰. Por tanto, la acción de esta citoquina permite amplificar y perpetuar la respuesta inflamatoria⁶¹. Otra de las funciones que comparte con el TNF- α es la estimulación de la producción de ciertas metaloproteinasas de matriz (MMPs) y la inhibición de algunos de sus inhibidores (TIMPs)⁶².

2.6. TNF- α

La familia del TNF consta de al menos 18 miembros distintos que exhiben del 15-25 % de homología en su secuencia de aminoácidos⁶³. El TNF- α es una citoquina primaria que se expresa como una proteína transmembrana en la superficie celular con un tamaño de 25 kDa, y que se ensambla como un homotrímero⁶⁴. Esta proteína actúa vía los receptores de superficie celular p55 y p75, los cuales median todas las acciones conocidas de dicha citoquina⁶⁵. Los monocitos y los macrófagos son los principales productores de TNF- α , pero también puede ser producido por otros tipos celulares como los linfocitos T, las células natural “killer” (NK), las células musculares lisas, endoteliales y algunas células tumorales⁶⁶.

Los macrófagos activados secretan TNF- α que activa el endotelio y aumenta la permeabilidad vascular, lo que conduce a un incremento en la entrada de IgG, sistema del complemento y de células a los tejidos, así como un drenaje elevado de fluidos a los ganglios linfáticos⁶⁷. Los efectos sistémicos de esta citoquina son fiebre, movilización de metabolitos y shock⁶⁸. Por otro lado, el TNF- α induce la contención local de la infección⁶⁹. Sin embargo, una vez que la infección se extiende por el torrente sanguíneo, TNF- α es liberado de forma sistémica provocando vasodilatación y pérdida de volumen plasmático debido al aumento de la permeabilidad vascular, lo cual conduce al shock⁷⁰. En el shock séptico, el TNF- α favorece la formación de coágulos en los vasos pequeños y el consumo masivo de proteínas de la coagulación⁷¹.

Por otro lado, el TNF- α puede disminuir la actividad de la óxido nítrico sintasa 3 u óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3 o eNOS) dando lugar a una disminución de la expresión de los genes relacionados con la fosforilación oxidativa mitocondrial, el aumento de estrés oxidativo (EOx) celular y la acumulación de las especies reactivas del oxígeno (EROs)⁷². Al igual que ocurre con la IL-1 β favorece la síntesis de IL-6 y estimula la actividad ciclooxigenasa, amplificando y perpetuando de este modo la respuesta inflamatoria⁷³. Además, influye en el metabolismo lipídico, regula la síntesis de fibrinógeno y de Factor VII, y favorece un estado pro-trombótico⁷⁴.

2.7. IL-6

La IL-6 es una citoquina de aproximadamente 26 kDa que es sintetizada por los fagocitos mononucleares, las células endoteliales vasculares, los fibroblastos, algunas células T activadas y otros tipos de células en respuesta a IL-1 y, en menor medida, a TNF- α ⁷⁵. La forma funcional de la IL-6 es como homodímero, y regula la respuesta humoral y celular, además de desempeñar un papel clave en la inflamación y el daño tisular⁷⁶.

El receptor de IL-6 está compuesto por 2 glicoproteínas, una proteína de unión al ligando (IL-6R α), y una subunidad de traducción de señal (IL-6R β o gP130)⁷⁷. Las dos acciones mejor descritas de la IL-6 son: 1) Estimular a los hepatocitos a sintetizar varias proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno, que contribuye a la respuesta de fase aguda. 2) Estimular la diferenciación y maduración de las células B⁷⁸. Además, esta citoquina puede también actuar junto a otras como cofactor de crecimiento de las células madres hematopoyéticas en la médula ósea e induce la proliferación de células de músculo liso⁷⁹.

La IL-6 tiene un papel central en la respuesta inflamatoria y se expresa en lesiones arterioscleróticas humanas, encontrándose en grandes cantidades en placas arterioscleróticas⁸⁰. Se sabe que esta citoquina puede estimular la agregación plaquetaria y la expresión del factor tisular, incrementar los receptores de LDL en macrófagos y aumentar las concentraciones en plasma del fibrinógeno, el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y la PCR⁸¹. Además, regula la expresión de diversas citoquinas como IL-1 y TNF- α , así como aumentar la síntesis de IL-2⁸².

2.8. MCP-1

MCP-1 es una quimioquina que pertenece a la subfamilia β (CC) (CCL2), cuyos componentes presentan dos residuos de cisteína conservados adyacentes en la posición N-terminal⁸³. MCP-1 se expresa en los monocitos, las células del músculo liso, las células endoteliales, hepáticas y sinoviales, los fibroblastos, los monocitos cardíacos y ciertas líneas de células tumorales⁸⁴. Esta quimioquina ejerce sus efectos mediante su interacción con el receptor de quimiocina-2 en

numerosos tipos celulares entre los que se encuentran los monocitos, que lo expresan de forma constitutiva y, las células T, que sólo lo expresan después de ser activadas⁸⁵.

Una de las funciones de MCP-1 es regular la migración e infiltración de los monocitos y otras células mononucleares en los sitios de inflamación⁸⁶. En el desarrollo de la arteriosclerosis, esta quimiocina funciona reclutando a los monocitos en la capa sub-endotelial. Además, en presencia de factores de riesgo aterioscleróticos, la expresión de MCP-1 se aumenta en las lesiones⁸⁷.

2.9. MIF-1

MIF-1 es una linfoquina de unos 12-13 kDa secretada principalmente por los linfocitos T activados, aunque también por los macrófagos, las células del músculo liso o las células de órganos como el hígado, el corazón, el tejido adiposo, el bazo, el riñón y la hipófisis entre otros⁸⁸. Se considera que MIF-1 es clave en la respuesta inflamatoria local y sistémica, así como en la respuesta inmune⁸⁹. Además, posee un papel crucial en la proliferación y diferenciación celular⁹⁰.

Por otro lado, se sabe que MIF-1 se libera por los monocitos/macrófagos en respuesta a glucocorticoides, lo que daría lugar a una disminución del efecto inmunosupresor de los mismos en la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias⁹¹. Este mecanismo podría estar involucrado en la progresión de la arteriosclerosis y, por tanto, en las enfermedades cardiovasculares⁹². De acuerdo con esta afirmación, se ha comprobado que MIF-1 es un mediador de la inflamación y que en los macrófagos puede estimular la expresión de diversas citoquinas como la (IL-1 β , el TNF- α o la IL-6)⁹³.

2.10. MMPs

Las MMPs son una familia de proteasas encargadas del remodelado de la matriz extracelular⁹⁴. Están constituidas por más de 20 enzimas proteolíticas⁹⁵. La estructura común a todas las MMPs consiste en una secuencia de aminoácidos con un pro-dominio y con un dominio catalítico de átomos de Zn⁺⁺ y Ca⁺⁺⁹⁶. La mayoría de las MMPs tienen dominios adicionales, como una región para la hemopexina y otra para la fibronectina⁹⁷. La actividad de las MMPs está regulada a múltiples niveles: 1) la síntesis de las MMPs está controlada a nivel transcripcional a la acción de oncogenes, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas sobre las regiones promotoras del gen; 2) las MMPs son secretadas como zimógenos inactivos que requieren un proceso proteolítico para liberar la zona catalítica; 3) la regulación de la actividad de las MMPs se consigue a través del bloqueo de la actividad enzimática mediada por activadores tisulares, de los que se conocen cuatro miembros (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4), que difieren en sus patrones de expresión y en su afinidad por los diversos tipos de MMPs⁹⁸. Dependiendo de la especificidad del sustrato, la similitud de aminoácidos y los módulos de secuenciación

identificables, la familia de las MMPs se puede clasificar en cuatro subclases: 1) Colagenasas, 2) Estromelisin, 3) Gelatinasas 4) MMPs tipo membrana⁹⁹.

2.10.1 MMP-9

La metaloproteínasa 9 (MMP-9) pertenece a la subclase gelatinasa de las MMPs. Se produce en queratinocitos, monocitos, macrófagos alveolares, leucocitos polimorfonucleares, células musculares lisas, macrófagos, fibroblastos y una gran variedad de células tumorales. Esta MMP tiene un peso molecular de 92 kDa. La MMP-9 actúa sobre colágeno tipo IV, V, VII, X y XIV, gelatina, elastina, glectina-3, agrecán, hialuronidasa-versican, proteoglicanos unidos a proteínas, fibronectina, entactina, osteonectina, α 1-antitrombina, IL-1 β y plasminógeno.

La MMP-9 participa en varias etapas de la arteriosclerosis. Las células espumosas aumentan la expresión de la MMP-9 en respuesta a lipoproteínas oxidadas y citoquinas, facilitando la migración de las células musculares. Esta MMP puede ser un mediador de la enzima dinucleótido de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) oxidasa dependiente de la producción de EROs en los procesos arterioscleróticos, además, estudios previos sugieren que la actividad de la NADPH oxidasa incrementa significativamente después de un desayuno hipercalórico.

2.11. Adipoquinas

Las adipoquinas comprenden un grupo de hormonas secretadas por los adipocitos de las cuales las más estudiadas son la leptina y la adiponectina aunque se conocen más de 100 diferentes. En este grupo se incluyen la adiponectina, la resistina, la leptina, la omentina o la visfatina. La función de las adipoquinas puede ser autocrina, paracrina y endocrina. Sus principales funciones incluyen una amplia gama de aquellas que intervienen en el metabolismo, como por ejemplo la regulación del apetito y del balance energético, sensibilidad a la insulina, regulación de la presión arterial, homeostasis vascular, inflamación y respuesta inmune, las cuales implican al tejido adiposo en múltiples interacciones con otros tejidos¹⁰⁰.

2.11.1. Adiponectina

La adiponectina es una adipoquina de 30 kDa codificada por el gen AMP1 (3q27) y expresada casi exclusivamente en el tejido adiposo blanco. Esta adipoquina tiene dos receptores: 1) un receptor con dos proteínas trans-membrana similares y con homología a receptores de unión a la proteína G, conocidos como adipoR1 y adipoR2. 2) El segundo es la T-cadherina muscular, que funciona como receptor de alta afinidad para la adiponectina globular. Existen receptores para la adiponectina en hígado, músculo esquelético, células β y cerebro. Entre las funciones de la adiponectina se encuentran la inhibición de la adhesión de los monocitos a las células endoteliales, la transformación de macrófagos en células espumosas y la activación de

células endoteliales. Además, esta adipoquina favorece la producción de óxido nítrico (ON), puesto que incrementa la actividad de la enzima eNOS. Ejerce también un efecto sinérgico con la leptina para mejorar la sensibilidad a la insulina. Dentro de sus efectos metabólicos, se encuentran una mejora de la sensibilidad a la insulina en el hígado, un descenso del flujo de los ácidos grasos no esterificados (NEFAs), un incremento de la oxidación de las grasas y una reducción de la liberación de glucosa hepática. En el músculo, la adiponectina estimula la utilización de glucosa y la oxidación de los ácidos grasos. Por otro lado, bajos niveles de adiponectina se asocian con la aparición de HTA (hipertensión arterial), sobrepeso, obesidad, hipertrigliceridemia y disminución de los niveles de HDL, alteraciones todas ellas características de los pacientes con SMet. También actúa sobre células miocárdicas impidiendo su muerte, atenúa el daño isquémico y promueve la revascularización¹⁰¹.

2.11.2. Resistina

La resistina es una adipoquina de 94 aminoácidos producida fundamentalmente por los adipocitos y macrófagos de tejido adiposo, aunque también se ha detectado expresión de resistina en células de otros órganos como el pulmón o el músculo esquelético.

La expresión de resistina se encuentra incrementada en el tejido adiposo de obesos y, varios estudios han confirmado la relación de esta adipoquina con la obesidad y la DMT2. Además, la resistina disminuye la actividad de la enzima eNOS, induce la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, y se relaciona de manera directa con la disfunción endotelial y la HTA. Por otro lado, existen estudios que muestran que la resistina tiene un papel importante en las enfermedades inflamatorias, induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α , IL-6 e IL-12 por los macrófagos y bloquea los efectos antiinflamatorios de la adiponectina¹⁰².

2.11.3. Leptina

La leptina es una adipoquina de 167 aminoácidos con una secuencia señal de 21 aminoácidos que se escinde antes de secretarse al torrente circulatorio. La proteína madura de 146 aminoácidos presenta una estructura terciaria similar a la de la IL-2. La expresión de esta adipoquina puede producirse en células del músculo esquelético, del hígado o de la pared gástrica, pero sobre todo su expresión es a nivel del tejido adiposo y específicamente en los adultos a nivel de los depósitos subcutáneos.

Su expresión y concentración se asocia directamente con la cantidad de masa grasa y los cambios en el peso corporal, cuando existe una cantidad excesiva de adipocitos y de TG almacenados en los mismos aumentan sus niveles e informa al cerebro con el fin de inhibir el apetito, razón por la cual también se le confiere la propiedad de actuar como saciante ya que también aumenta después de la ingesta de una comida¹⁰³.

2.12. Alteraciones metabólicas del síndrome metabólico y su relación con la inflamación

2.12.1. Inflamación, obesidad y Síndrome Metabólico

La obesidad se define como un exceso de adiposidad corporal que en términos cuantitativos supone un $IMC \geq 30$. Hoy día sabemos que la obesidad juega un papel central y causal en el SMet¹⁰⁴⁻¹⁰⁵. De hecho, el incremento de la prevalencia de la obesidad se relaciona con un incremento en la prevalencia del SMet¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. El tejido adiposo está compuesto de adipocitos, preadipocitos del estroma, células inmunes y endotelio vascular. Este tejido desempeña un papel importante en la homeostasis energética de todo el cuerpo, ya que es capaz de responder rápida y dinámicamente al exceso de nutrientes a través de la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos para almacenar el exceso de energía derivado de un balance energético positivo, que conduce al desarrollo de obesidad¹⁰⁸.

La obesidad abdominal es una de las principales características del SMet, y representa un marcador de la resistencia a la insulina y del propio tejido adiposo disfuncional¹⁰⁹. Según los criterios del ATP III, se considera que los hombres tienen obesidad abdominal cuando la circunferencia de la cintura es igual o superior a 102 cm y en las mujeres cuando es igual o mayor que 88 cm.

La hipertrofia de los adipocitos y la acumulación de grasa visceral resultan en trastornos endocrinos. La adiposopatía o disfunción del tejido adiposo se caracteriza por cambios anatómicos patogénicos producidos en respuesta a un balance energético positivo crónico, sedentarismo y predisposición genética que dependiendo de su interacción con otros tejidos del cuerpo, conduce a alteraciones metabólicas relacionadas con la resistencia a la insulina alteraciones vasculares y otros factores de riesgo que son componentes del SMet¹¹⁰.

La obesidad fue considerada como epidemia mundial por la Organización Mundial de la Salud en el año 1998, y su incremento a nivel mundial es atribuible a factores genéticos y moleculares, junto con circunstancias coadyuvantes y desencadenantes ambientales y conductuales¹¹¹. Entre los factores que intervienen en su patogenia se encuentran modificaciones de los hábitos higiénico-dietéticos, donde destacan la sobrenutrición con una elevada ingesta de grasa saturada y *trans*, generalmente acompañada de un menor consumo de micronutrientes procedentes de la fibra, fruta y verdura así como una disminución de la actividad física motivada por el desarrollo tecnológico de los países industrializados. Estos cambios han derivado en un incremento global de la incidencia de la DMT2 y la obesidad¹¹².

La mayoría de los pacientes obesos presentan una resistencia a la insulina subyacente, principal característica del SMet. Además, tienen el metabolismo de la glucosa alterado, lo que favorece el desarrollo de la DMT2, presentan HTA, disfunción endotelial e inflamación (aumento de IL-

6, IL-18, TNF- α o leptina y disminución de adiponectina) y también dislipemia (aumento de triglicéridos y disminución de HDL) ¹¹³.

El sobrepeso y la obesidad tienen graves consecuencias para la salud. La obesidad es un importante factor de riesgo de enfermedades crónicas, tales como:

- Las enfermedades cardiovasculares (especialmente la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular)
- La diabetes
- Las enfermedades del aparato locomotor, y en particular la artrosis

Multitud de estudios han evaluado las condiciones patofisiológicas que se asocian a la obesidad. Por ejemplo, el estudio de Ghanim y cols, los cuales realizaron un estudio comparando personas obesas y delgadas¹¹⁴, en los que compararon la actividad del NF- κ B y la expresión de moléculas inflamatorias que se encuentran moduladas por este factor de transcripción, en células mononucleares de sangre periférica. Los resultados obtenidos en los individuos obesos, mostraron una mayor actividad del NF- κ B y una mayor expresión de diversas citoquinas proinflamatorias (p105, IL-6, TNF- α , MMP-9, p65, MIF, PCR). Estos resultados están en concordancia con datos de otros estudios publicados previamente donde demostraron que el tejido adiposo de personas obesas expresaba mayores niveles de moléculas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, eNOS o MCP-1) y pro-trombóticos (factor tisular, Factor VII o PAI-1) que el tejido adiposo de individuos delgados^{115,116}. Por otro lado, Sheu y cols estudiaron los cambios ocurridos, a nivel de inflamación, tras la pérdida de peso en individuos obesos¹¹⁷. Los resultados obtenidos fueron sorprendentes, ya que, tras la pérdida de un 5 % del peso corporal se producía una disminución de la actividad del NF- κ B y de la expresión de varias citoquinas pro-inflamatorias.

En resumen, la disfunción del tejido adiposo y las patologías metabólicas y vasculares presentes en la obesidad, tienen como un punto de unión la inflamación sistémica de bajo grado, siendo ésta un factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares¹¹⁸.

Aunque la obesidad se relaciona de forma directa con enfermedad se ha observado que no todas las personas obesas presentan alteraciones metabólicas. A pesar de que el IMC se relaciona de manera directa con el sobrepeso (IMC > 25) y la obesidad, se ha observado un fenotipo correspondiente a individuos obesos metabólicamente sanos (IMC elevado pero sin las alteraciones metabólicas típicas de individuos obesos) y un fenotipo correspondiente a individuos con IMC < 25 pero metabólicamente obesos (presentan las alteraciones metabólicas características del SMet)¹¹⁹.

Según la teoría de expandibilidad del tejido adiposo, se ha propuesto que existe una unión, a nivel epidemiológico, entre la obesidad y la DMT2, y que el mecanismo subyacente es la capacidad de expansión del tejido adiposo. Según esta teoría, el tejido adiposo de cada individuo tiene una capacidad de expansión limitada que está determinada por factores genéticos y ambientales. Una vez que el tejido adiposo llega a su límite de expansión, pierde la capacidad de almacenar la grasa de manera eficiente, y ésta tiende a acumularse en otros órganos en los que se generan fenómenos de resistencia a la insulina, apoptosis, inflamación y complicaciones cardiovasculares (**Figura 1**).

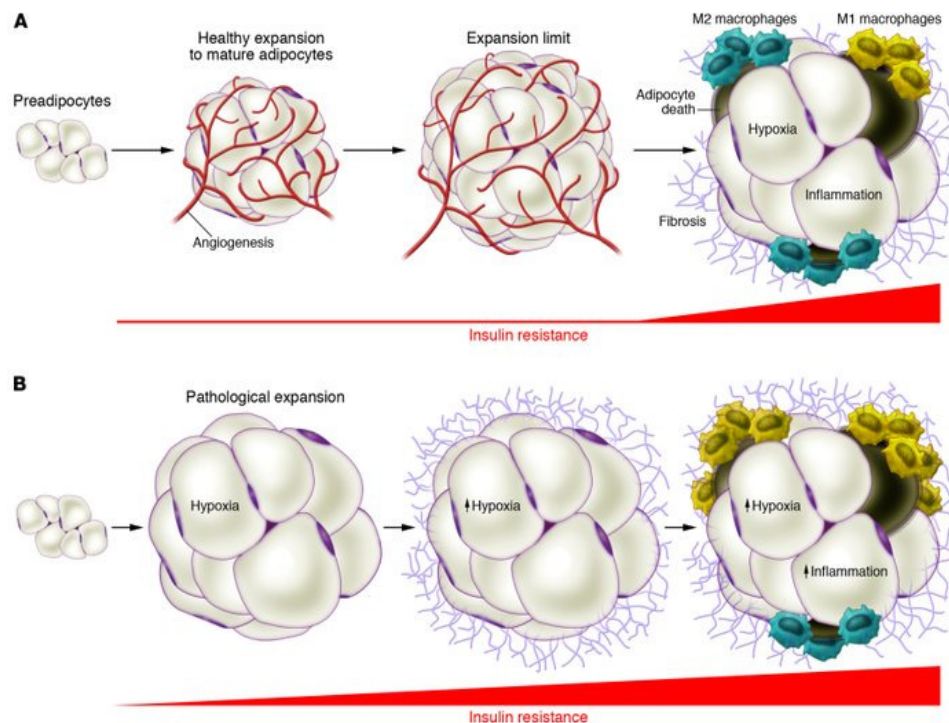


Figura 1. Expansión y remodelado del tejido adiposo. A) Expansión fisiológica. B) Expansión patológica¹²⁰.

2.12.2. Inflamación, dislipemia y Síndrome Metabólico

Existen varias causas por las que se asocia al SMet con un incremento del riesgo de ECV pero se ha demostrado que la dislipemia (alteraciones del metabolismo lipídico) juega un papel especialmente relevante¹²¹. La dislipemia se define como un aumento de los niveles de triglicéridos (TG) y de LDL pequeñas y densas y de un descenso de las HDL. La dislipemia está relacionada con la obesidad y la resistencia a la insulina, y podría explicarse por un aumento en los niveles de NEFAs en el hígado, debido a un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo, que estimulan la síntesis de partículas ricas en TG (LRTs) y de VLDL por los hepatocitos. Este

aumento en las partículas de VLDL provoca un descenso en los niveles de HDL por la actuación de la proteína transportadora de esteres de colesterol, las HDL se enriquecen en TG, se hacen más pequeñas y por medio de la enzima lipasa hepática se catabolizan, razón por la cual al aumentar los niveles de TG disminuyen los de HDL¹²².

En el *United Kingdom Prospective Diabetes Study*, la dislipemia se asoció con factores de riesgo para ECV y DMT2, particularmente en las mujeres del estudio¹²³. Los datos obtenidos en el *Quebec Cardiovascular Study* mostraron la presencia de LDL pequeñas y densas asociadas con un incremento del riesgo de cardiopatía isquémica y de DMT2¹²⁴. Además, en un estudio llevado a cabo en una población norteamericana (*NHANES-III*) se demostró la presencia de niveles de TG superiores a 150 mg/dl en más del 30% de los casos y una HDL por debajo de sus límites en el 37%, solo precedidos en frecuencia por la obesidad, todo ello en una población en la que el 24% de los voluntarios tenía SMet¹²⁵.

Hay evidencias claras de la relación entre la hipertrigliceridemia, la resistencia a la insulina y la enfermedad coronaria¹²⁶. La hipertrigliceridemia ocasiona una disfunción del endotelio asociada a una producción incrementada de anión superóxido (O_2^-) vascular y el consiguiente descenso de ON. Parece que después de la ingesta de comida, las lipoproteínas, particularmente los quilomicrones y las VLDL, inducen la generación de radicales libres de oxígeno en la superficie endotelial que reaccionan con el ON reduciendo su biodisponibilidad. Esto es especialmente importante en los pacientes con SMet muestran una elevada trigliceridemia¹²⁷ y anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas en el postprandio¹²⁸. Esto último ha servido de argumento para considerar al SMet una enfermedad postprandial.

Por otro lado, se ha relacionado la inflamación con alteraciones en el metabolismo lipídico. De hecho, se ha mostrado que la trigliceridemia postprandial puede estar relacionada con el estado pro-inflamatorio caracterizado por un incremento en la expresión de marcadores de activación de monocitos¹²⁹. Los niveles circulantes de TNF- α se relacionan negativamente con el tamaño de las LDL. Las citoquinas podrían modular las concentraciones de las lipoproteínas a través de diversos mecanismos: el TNF- α y la IL-1 inhiben el transporte inverso de colesterol a las células por una disminución del ARN mensajero (ARNm) y la proteína ABCA1 (*ATP binding cassette A1*)¹³⁰.

2.12.3. Inflamación, disfunción endotelial, hipertensión y Síndrome Metabólico

Según los criterios de la ATP III para el diagnóstico del SMet, se considera que un paciente tiene HTA cuando su presión arterial sistólica y diastólica es superior a 130/85 mm Hg, respectivamente. La relevancia de la HTA es que supone un trastorno grave que conduce a un mayor riesgo de ECV¹³¹.

Las paredes de las arterias tienen una capa de tejido muscular y elástico que las hace flexibles, y capaces de dilatarse y contraerse a medida que la sangre fluye a través de ellas. La presión arterial elevada puede hacer que las paredes de las arterias se endurezcan y se vuelvan más rígidas¹³². Cuando las arterias se endurecen, el interior de los vasos sanguíneos se estrecha, lo que puede condicionar una falta de aporte de riego sanguíneo a diversos órganos, entre ellos el corazón, incrementado de este modo, el riesgo de aparición de cardiopatía isquémica¹³³⁻¹³⁴.

La etiología de la HTA se encuentra relacionada con el estilo de vida, la dieta y una serie de factores psicosociales, así como con otros factores fisiopatológicos tales como la inflamación crónica, la obesidad y la disfunción endotelial¹³⁵. Se ha demostrado que en condiciones de inflamación se reduce la síntesis de ON en las células endoteliales, y estimulan la disfunción endotelial¹³⁶. De hecho, diferentes estudios han encontrado elevados niveles de marcadores inflamatorios circulantes (IL-6, IL-1, TNF- α o PCR) en sujetos con elevada presión sanguínea o con HTA¹³⁷. La aparición de la disfunción endotelial también se debe al aumento de los NEFAs que dificultan la vasodilatación inducida por la insulina en el músculo esquelético, y que además, junto con la IL-6 aumentan la producción de fibrinógeno, factor determinante en la viscosidad sanguínea¹³⁸.

Por otra parte, el aumento en la producción de angiotensinógeno por los hepatocitos implica un aumento en la cantidad de angiotensina II, molécula que favorece la disfunción endotelial, ya que: 1) estimula la expresión de moléculas de adhesión y MCP-1 en las células endoteliales, 2) promueve la formación de radicales libres a partir del ON, disminuyendo así su biodisponibilidad y 3) favorece la angiogénesis y la HTA¹³⁹. La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia pueden promover *per se* la HTA. Además se ha comprobado que entre los pacientes obesos existe mayor prevalencia de HTA y que ésta puede revertirse con la pérdida de peso¹⁴⁰. En el registro *NHANES III (tercera encuesta nacional de salud americana)*, entre los sujetos con $\text{IMC} \geq 30$ existía 2 veces más porcentaje de hipertensos que entre los no obesos. Este hecho podría deberse a que en los obesos se produce una retención de sodio, un estímulo del sistema renina angiotensina aldosterona con efectos hipertensores, también hay cambios en la actividad de la ATPasa Na⁺/K⁺ y cambios en la estructura de la pared arterial mediados por factores de crecimiento¹⁴¹, así como una inflamación de bajo grado que a su vez genera resistencia a insulina. Ambos procesos promueven la HTA. Se ha descrito que pacientes con HTA tienen menor actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)¹⁴². En pacientes hipertensos con otros componentes del SMet se detectaron marcadores elevados de EOX y una capacidad antioxidante deprimida tanto en plasma como en PBMCs, mostrando el papel determinante que el EOX y disfunción endotelial tienen en la HTA¹⁴³.

Diversos estudios clínicos y experimentales le han asignado importancia al EOX en la génesis de la HTA, puesto que el incremento de los radicales libres puede afectar la estructura y función

de la pared vascular, efecto que se traduce en un aumento de la presión arterial de forma crónica¹⁴⁴. En la HTA esencial se produce en forma primaria, una alteración de la función vasodilatadora del endotelio¹⁴⁵. Este efecto puede obedecer tanto a factores genéticos como ambientales; pero además, la misma elevación de la presión arterial puede contribuir a generar disfunción endotelial¹⁴⁶. El endotelio tiene un papel clave en la regulación del tono vascular, dado que sintetiza y libera un espectro de sustancias vasoactivas vasoconstrictoras como la endotelina, y vasodilatadoras como el ON y la prostaciclina (PGI_2)¹⁴⁷. En consecuencia, el EOx altera la respuesta vasomotora de la pared vascular, disminuyendo la efectividad vasodilatadora a agentes como acetilcolina o bien exacerbando el efecto de los vasoconstrictores¹⁴⁸. Diversas propiedades de los radicales libres permiten dar explicación a estos hallazgos¹⁴⁹. De esta manera, el aumento de la producción o una menor depuración de O_2^- causa una inactivación del ON, sustancia vasodilatadora con la que reacciona para formar peroxinitrilo¹⁵⁰. A su vez, el peroxinitrito (ONOO^-) tiene un efecto peroxidante sobre el ácido araquidónico que conduce a la formación de F2-isoprostanos¹⁵¹.

La mayoría de los estudios coinciden en que los sujetos con HTA tienen un metabolismo anormal y/o dislipemia más a menudo que los sujetos sanos. Los estudios clásicos han demostrado que los pacientes hipertensos tienen curvas anormales de sobrecarga de glucosa e hiperinsulinemia. Incluso se ha argumentado que la HTA es una manifestación de la resistencia a la insulina. Por esta razón, los pacientes con HTA tienen una elevada prevalencia de SMet¹⁵²⁻¹⁵³.

2.12.4. Inflamación, resistencia a la insulina y Síndrome Metabólico

Una medida de la glucosa en ayunas ≥ 100 mg/dl suele ser un indicador de la resistencia a la insulina, y es acompañada con frecuencia de otros componentes del SMet. Además, para un porcentaje de aquellos con alteración de la glucosa en ayunas, es un factor de riesgo o predictivo para el desarrollo de DMT2. Aunque el ATP III no consideró la determinación de la resistencia a la insulina un criterio para el diagnóstico del SMet, se acepta generalmente como una característica de este síndrome¹⁵⁴.

La resistencia a la insulina que se manifiesta en órganos y tejidos como el hígado, tejido adiposo y muscular y también en el endotelio, se caracteriza por una menor actividad biológica de la insulina debido a la imposibilidad de transducción de la señal necesaria a sus receptores y se expresa en sus diferentes acciones metabólicas, siendo la más evidente en el metabolismo de la glucosa. La disminución de la sensibilidad a la insulina es también un factor clave en el desarrollo del SMet. Algunos investigadores dan más prioridad a la resistencia a la insulina que a la obesidad en la patogénesis del SMet. No obstante, es muy complicado separar estos trastornos e identificar un papel único de resistencia a la insulina.

La disminución de la respuesta tisular a la acción de la insulina produce un aumento de los niveles plasmáticos de insulina, una condición que se denomina hiperinsulinemia¹⁵⁵. Aunque la hiperinsulinemia puede compensar la resistencia a la insulina a algunas acciones biológicas de la insulina, por ejemplo, el mantenimiento de la normoglucemia, puede, sin embargo, causar una sobreexpresión de la actividad de la insulina en algunos tejidos normalmente sensibles¹⁵⁶. Esta acentuación de algunos de los efectos de la insulina, junto con una resistencia a otros, da como resultado las manifestaciones clínicas del SMet como alteración del metabolismo de la glucosa, conduciendo finalmente a una hiperglucemia, debido a una incapacidad de las células beta pancreáticas de producir suficiente insulina para mantener niveles normales de glucosa¹⁵⁷. Además, esta resistencia a la insulina se asocia con un estado inflamatorio crónico de bajo grado y un mayor EOX, ambas características del SMet¹⁵⁸.

La resistencia a la insulina puede deberse a defectos del receptor de la insulina o también por trastornos de su acción a nivel post-receptor. Las mutaciones del receptor suelen ser poco frecuentes, por lo que, en la mayoría de los pacientes que tienen resistencia a la insulina hay defectos post-receptor derivados de alteraciones genéticas y cuya expresión clínica es favorecida por la concurrencia de factores ambientales y la obesidad abdominal, aunque también influyen el sedentarismo o el tabaquismo. La mayoría de los pacientes obesos presentan una resistencia a la insulina debido a la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad. En presencia de obesidad, el aumento de la infiltración de moléculas inmunes en el tejido adiposo provoca que éste libere cantidades mucho más elevadas de citoquinas inflamatorias, en concreto TNF- α , IL-6 y de resistina, que provocan que este tejido se vuelva resistente a la acción de la insulina¹⁵⁹. Además, también se ha descrito un descenso plasmático en las concentraciones de adiponectina en condiciones de obesidad, lo que se ha asociado a la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia y la intolerancia a la glucosa¹⁶⁰.

En un contexto de inflamación crónica de bajo grado, característica en condiciones de obesidad, una de las moléculas más importantes desde un punto de vista mecanístico en cuanto a la condición de resistencia a la insulina es el TNF- α , ya que se ha descrito que induce una disminución de la expresión del receptor de la insulina, además, reduce la fosforilación de residuos tirosina del sustrato del receptor de la insulina 1, necesaria para la progresión de la señal intracelular de la insulina y disminuye la expresión génica del transportador de glucosa sensible a la insulina (GLUT)-4¹⁶¹. De este modo, parece evidente que niveles elevados de TNF- α en el tejido adiposo podrían ser la unión existente entre obesidad, resistencia a la insulina y el desarrollo de SMet¹⁶².

3. SINDROME METABOLICO Y ESTRÉS OXIDATIVO

El EOx se define como un desequilibrio celular entre la producción de EROs y sus mecanismos de defensa de eliminación, conocidos como sistemas antioxidantes¹⁶³. Existe una amplia evidencia de que, en estado fisiológico, las EROs se generan continuamente dentro de las células eucariotas como subproductos de las reacciones metabólicas¹⁶⁴. Esta producción es estrictamente controlada para mantener un equilibrio de oxidación-reducción (equilibrio redox), necesaria a su vez para el buen funcionamiento del organismo. Existen dos situaciones que pueden comprometer este equilibrio redox, y conducir al desarrollo del EOx: cuando la generación de EROs excede la capacidad del sistema de neutralizarlas y eliminarlas o cuando hay una falta de capacidad antioxidante causada por una perturbación en su producción o distribución. Las consecuencias del EOx incluyen el daño celular, que conduce a la modificación del ADN, los lípidos, las proteínas y los carbohidratos, comprometiendo la viabilidad celular¹⁶⁵. El daño oxidativo, particularmente en el ADN, puede desencadenar la muerte celular por apoptosis o necrosis.

El EOx se asocia con numerosos mecanismos patológicos, como el SMet, la DMT2, enfermedades inflamatorias, arteriosclerosis o cáncer, así como con el proceso del envejecimiento, en los cuales, los niveles de EROs aumentan¹⁶⁶.

3.1. Especies reactivas de oxígeno

Es un hecho bien conocido que la mayoría de los organismos vivos dependen del oxígeno para sobrevivir. Sin embargo, los organismos han tenido que protegerse de la toxicidad del oxígeno debido a su propensión química a producir radicales libres tales como el O_2^- o el radical hidroxilo (-OH). Estos radicales pueden estar implicados en reacciones químicas subsecuentes que producen moléculas adicionales que también pueden provocar daño celular, aunque no son necesariamente radicales libres¹⁶⁷. Por lo tanto, las EROs y especies reactivas del nitrógeno (ERN) son términos colectivos para los radicales y no radicales derivados del metabolismo del oxígeno y el nitrógeno, respectivamente, que tienen una semivida extremadamente corta¹⁶⁸.

En términos de reactividad con moléculas biológicas, -OH es el más reactivo, con una vida útil de 9 segundos y, prácticamente, ninguna selectividad para reaccionar con la mayoría de los compuestos¹⁶⁹. Por el contrario, O_2^- es menos reactivo y más selectivo. En los sistemas biológicos es capaz de formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de una reacción de auto-dismutación en pocos segundos. El O_2^- también participa en una reacción controlada por difusión con ON para producir un potente y reactivo ERN, $ONOO^-$, que oxida los ácidos grasos insaturados en las membranas biológicas y también reacciona fácilmente con el ADN, bases oxidantes de purina y pirimidina^{169,170}. La mayor parte de la citotoxicidad atribuida al ON se debe más bien al $ONOO^-$, ya que el ON es un gas esencial de radicales libres que actúa como

molécula mensajera intracelular en el proceso de relajación del músculo liso y juega un papel fundamental en la función endotelial¹⁷¹. De hecho, se ha establecido que un incremento en los niveles de EOX, junto con un deterioro en la disponibilidad de ON, puede causar alteración de las células endoteliales que ocasionan disfunción endotelial¹⁷². Estos hallazgos se reflejan generalmente en la disminución de la hiperemia isquémica reactiva (IRH), método utilizado para medir los cambios en la reactividad endotelial aguda¹⁷³.

Se ha descrito que la mayoría de las EROs generadas endógenamente proceden de las mitocondrias, donde la mayor parte del oxígeno consumido por los organismos aeróbicos se reduce a agua. Sin embargo, una pequeña proporción del oxígeno se convierte en O_2^- en dos lugares concretos de la cadena de transporte de electrones: Complejo I (NADH deshidrogenasa) y Complejo III (Ubiquinol-citocromo-c reductasa)¹⁷⁴. Durante el proceso respiratorio, la semiquinona de radicales libres (Q \cdot), que actúa como mediadora en la regeneración de la coenzima Q, transfiere un electrón al oxígeno molecular de forma no enzimática, generando O_2^- . De esta manera, el flujo de O_2^- está relacionado con la concentración de potenciales donadores de electrones, la concentración local de O_2 y las constantes de velocidad de segundo orden para las reacciones entre ellas¹⁷⁵.

3.2. NADPH oxidasa

Los sistemas enzimáticos citosólicos que pueden contribuir al aumento del EOX incluyen a la familia de las oxidasas de dinucleótido de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH). Estas enzimas fueron descritas por primera vez en fagocitos, participando en la defensa contra patógenos a través de la generación de oxidantes antimicrobianos, como O_2^- , o de oxidantes derivados de O_2 , siendo probable que sean la fuente predominante de EROs en la vasculatura humana¹⁷⁶. La activación del complejo enzimático NADPH oxidasa requiere el ensamblaje de las subunidades reguladoras citosólicas (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} y rac) con el citocromo b558 unido a la membrana (subunidades gp91^{phox} p22^{phox})¹⁷⁷.

3.3. Sistema de defensa antioxidante

Con el fin de disminuir las agresiones oxidativas, intrínseca y extrínsecamente generadas, que pueden amenazar el estado redox celular, las células poseen sistemas de defensa antioxidante altamente regulados que contribuyen a mantener un funcionamiento óptimo del organismo. Estos mecanismos están divididos en sistemas enzimáticos y no enzimáticos. La defensa antioxidante primaria está formada por varias proteínas complejas enzimáticas que a menudo incorporan minerales como selenio o zinc en sus estructuras. Dentro de este grupo, las principales enzimas antioxidantes incluyen glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y SOD, que actúan como la defensa más potente contra los radicales libres y las reacciones inflamatorias subsiguientes del organismo. Por otro lado, el grupo antioxidante no enzimático incluye

vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (alfa-tocoferol), provitamina A (beta-caroteno), glutatión (GSH), tiorredoxina (Trx), polifenoles y numerosos agentes fitoquímicos. Las células deben conservar los niveles de todas estas especies antioxidantes, también definidas como potencial antioxidante, mediante síntesis endógena o consumo de dieta¹⁷⁸.

3.3.1 Regulación Nrf2

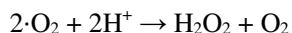
La eficiencia de todo el conjunto de mecanismos antioxidantes radica en su capacidad para ajustarse a niveles crecientes de EOX a través de la expresión regulada de sus subcomponentes. Esta respuesta adaptativa es impulsada por un grupo de factores de transcripción donde el factor nuclear eritroide 2 – factor 2 relacionado (Nrf2) actúa como conductor de orquesta mediante la regulación de la defensa celular inducible a través de la vía Keap-1/Nrf2/ARE.

El factor de transcripción Nrf2 se encuentra en el citoplasma celular, en condiciones normales, asociado a la proteína Keap-1. En ausencia de EOX, Keap-1 limita la actividad de Nrf2 promoviendo su degradación a través de la vía ubiquitin proteasoma¹⁷⁹. Como resultado, Nrf2 experimenta un ciclo constante de producción y descomposición que determina su semivida relativamente corta (10-30 minutos)¹⁸⁰. En respuesta a una agresión oxidativa, el Nrf2 evade la represión mediada por Keap-1 y se acumula dentro del núcleo, donde se dimeriza con proteínas de la familia Maf y se une, con afinidad específica, al elemento de respuesta antioxidante (ARE) situado dentro de la región promotora de genes que codifican diferentes proteínas antioxidantes y enzimas desintoxicantes de fase II, implicadas en la defensa celular¹⁸¹. De hecho, las ARE se han identificado en numerosos genes diana de Nrf2, como aquellos que codifican a proteínas relacionadas con la regulación del metabolismo del glutatión, enzimas antioxidantes especializadas en la desintoxicación de las EROs (como SOD, CAT, etc...), transportadores xenobióticos y otras proteínas de respuesta a EOX¹⁸². Por lo tanto, el Nrf2 incrementa la gama de procesos de defensa celular induciendo la expresión de una gran batería de genes, lo que a su vez aumenta la capacidad global de un organismo para desintoxicar y eliminar entidades potencialmente dañinas.

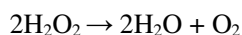
3.3.2 Enzimas antioxidantes: SOD, GPx y TrxR

En este sentido, una de las principales enzimas de la primera línea de la defensa antioxidante es la SOD, la cual consta de tres isoformas en mamíferos: la isoforma citoplasmática que está constituida por cobre (Cu), y zinc (Zn), Cu/ZnSOD (SOD1); la isoforma mitocondrial que está compuesta por manganeso (Mn), MnSOD (SOD2); y la isoforma extracelular también compuesta por Cu y Zn, Cu/ZnSOD (SOD3). En cada fracción subcelular, las SODs catalizan la reacción de dismutación de O_2^- a O_2 y H_2O_2 y comprenden una serie de reducciones y oxidaciones sucesivas de un metal de transición actuando como cofactores para

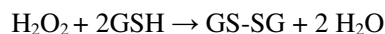
su activación¹⁸³. La distinta ubicación subcelular enfatiza la importancia de la compartimentación en la señalización redox.



En contraste con el O_2 , el H_2O_2 es capaz de difundirse a través de las membranas celulares¹⁸⁴ y generar OH^\cdot , radical críticamente reactivo en presencia de metales de transición reducidos tales como el hierro, como resultado de la reacción de Fenton. Puesto que el H_2O_2 es un potente oxidante, varios mecanismos están presentes en la célula para neutralizarla. La enzima universal implicada es la CAT, tetrámero que cataliza la descomposición de H_2O_2 en agua y oxígeno¹⁸⁵, según la siguiente reacción:



Además, el H_2O_2 y los hidroperóxidos orgánicos pueden reducirse a agua, o a los correspondientes alcoholes, a través de una reacción química catalizada por GPx, donde el glutatión reducido (GSH) actúa como donador de electrones¹⁸⁶:



o



GPx es el nombre general para una familia de isoenzimas que tienen una actividad de glutatión peroxidasa dependiente de selenio en mamíferos. Se ha sugerido que la presencia de selenocisteína en el centro catalítico garantiza una reacción rápida con el hidroperóxido y una reducibilidad rápida por GSH. Hay cuatro isoenzimas GPx principales y parecen tener una función antioxidante en diferentes localizaciones en compartimentos celulares: GPx1 ubicuo en el citosol y las mitocondrias (considerado como el prototipo de glutatión peroxidasa), GPx2 en el epitelio intestinal, GPx3 en plasma y GPx4 en membranas celulares^{186,187}.

Tiorredoxina reductasa (TrxR) pertenece a una familia de flavoenzimas que catalizan la transferencia de dos electrones de NADPH al sustrato, el cual es un nucleósido difosfato. Estas oxido-reductasas son necesarias para la reducción del disulfuro del sitio activo de la tiorredoxina (Trx), manteniéndolo así reducido y reactivo¹⁸⁸. También se ha descrito que los peróxidos, incluyendo hidroperóxidos de lípidos y peróxido de hidrógeno, pueden ser reducidos directamente por TrxR. Mediante este mecanismo, TrxR podría funcionar como una vía enzimática alternativa para la desintoxicación de los hidroperóxidos lipídicos, de otra manera principalmente administrada por GPx¹⁸⁹.

La efectividad de esta respuesta antioxidante compleja no sólo radica en su maquinaria enzimática, sino que merece la pena destacar el papel de los compuestos no enzimáticos que contribuyen en gran medida al mantenimiento del equilibrio redox. Un claro ejemplo de ello es la vitamina E liposoluble (alfa-tocoferol), cuya importante función está relacionada con su capacidad para retener la integridad de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en las membranas celulares (fluidez, separación de fases y dominios lipídicos) para preservar su bioactividad. Como estos lípidos bioactivos son importantes moléculas de señalización, los cambios en su cantidad o en su función debido a la oxidación afectan a las vías cruciales de señalización en las células¹⁹⁰. Otro compuesto esencial no enzimático es la vitamina C o ácido ascórbico, que actúa como un donante de electrones y un potente antioxidante soluble en agua en humanos. Está implicada en la neutralización de los radicales libres y la regeneración de la vitamina E. De hecho, ambas vitaminas se han sugerido para participar en la prevención de enfermedades cardiovasculares¹⁹¹.

3.4. Patologías asociadas al estrés oxidativo

La existencia de diversos mecanismos de producción de EROs y su complejidad pone de relieve el hecho de que estas especies tienen un papel crucial en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos humanos. De hecho, una gran cantidad de evidencia apoya la importancia de las EROs a niveles bajos y regulados¹⁹². Como se discutió anteriormente, una función inmune normal requiere estados oxidativos específicos. De hecho, la ausencia de la enzima NADPH oxidasa, generadora de EROs, conduce a la inmunodeficiencia asociada con infecciones recurrentes en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica¹⁹³. Además, las EROs tienen un papel en varias cascadas de señalización en relación con la estimulación del factor de crecimiento y el control de las respuestas inflamatorias¹⁹⁴ y también participan en la regulación de la apoptosis, la diferenciación, la proliferación y la migración¹⁹².

Por otra parte, la producción excesiva de EROs contribuye ampliamente al inicio y desarrollo de diversas patologías, siendo muchas de ellas una causa principal de muerte. El daño causado por las EROs al ADN es probablemente su principal implicación en el cáncer con cambios en el material genético, tales como la modificación de bases, reordenación de secuencias de ADN, codificación errónea de lesión del ADN, duplicación de genes y activación de oncogenes¹⁹⁵. Del mismo modo, el daño oxidativo se ha estudiado ampliamente en las enfermedades cardiovasculares. Según la teoría de EROx, la arteriosclerosis es el resultado de modificaciones oxidativas de LDL en la pared arterial por EROs¹⁹⁶. Además, los procesos patológicos como la lesión por isquemia/reperfusión y la hipertensión se han relacionado con cambios en la expresión de las enzimas óxido nítrico sintasas y, en consecuencia, la producción de EROs en las células vasculares¹⁹⁷. Otras patologías asociadas en gran medida con el envejecimiento y EROx son las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, donde las formas solubles de amiloide

pueden conducir a la activación de microglia y generación de EROs a largo plazo, contribuyendo al daño neuronal y finalmente a la demencia¹⁹⁸.

De la misma manera, el EOx juega un papel importante en la patogénesis del SMet¹⁹⁹. Diferentes observaciones experimentales y clínicas indican que el EOx es un mecanismo importante en el desarrollo del SMet asociado a la obesidad, así como en el desarrollo de diabetes y sus complicaciones. En un estudio transversal se ha observado una correlación positiva entre altos niveles de EOx y resistencia a la insulina, en pacientes obesos que presentaban SMet, en comparación con aquellos pacientes obesos pero sin SMet²⁰⁰. Otro estudio publicado determinó que, en sujetos no diabéticos, el incremento del EOx en tejido adiposo conduce a una desregulación en la producción de adipocitoquinas tales como IL-6, TNF- α o MCP-1 y esto a su vez, predispone al desarrollo del SMet²⁰¹. Recientemente nuestro grupo de investigación ha publicado que, además, el grado de EOx está directamente relacionado con el número de componentes de este síndrome, en pacientes con SMet²⁰². Sin embargo los mecanismos por los que se lleva a cabo no han sido completamente dilucidados.

3.5. Estrés oxidativo y envejecimiento

Según la Organización Mundial de la Salud, la proporción de la población mundial de más de 60 años se duplicará del 11% al 22% entre 2000 y 2050. El número de personas mayores de 60 años se espera que aumente de 605 millones a 2 millones en dicho periodo. De hecho, en casi todos los países las personas de más de 60 años están creciendo más rápido que cualquier otro grupo de edad, como resultado de una esperanza de vida más larga y tasas de fecundidad decrecientes²⁰³. Este envejecimiento de la población puede interpretarse como un hecho exitoso para las políticas de salud pública y para el desarrollo socioeconómico. Por otro lado, también presenta un desafío social y económico, ya que la necesidad de cuidados a largo plazo está aumentando exponencialmente. De hecho, se prevé que el número de ancianos que ya no pueden cuidar de sí mismos debido a problemas de salud física o mental se cuadruplicará para 2050²⁰⁴.

Debido a este problema de envejecimiento acelerado, numerosos estudios de investigación se han centrado más en prolongar la esperanza de vida. Dicho término enfatiza el objetivo de una vida sana y más larga. Se podría definir como el tiempo que un individuo es capaz de mantener una buena salud, lo que se reconoce por la capacidad de un sistema de retener o regresar a la homeostasis en respuesta a los desafíos²⁰⁵. Sin embargo, el término esperanza de vida no incluye explícitamente la calidad de vida, sólo se refiere al período de tiempo durante el cual un organismo vive o se espera que viva. Esta es la razón por la que la cuestión de cómo extender la vida útil y, al mismo tiempo, mantener la calidad de vida ha estado atrayendo una atención significativa durante la última década²⁰⁶.

El envejecimiento es un proceso biológico caracterizado por una disminución progresiva, fisiológica y dependiente del tiempo, de la función de un organismo, acompañada de disminución de la fertilidad y aumento de la mortalidad²⁰⁷. Los efectos de este proceso inevitable y complejo se manifiestan a nivel genético, molecular, celular, de órganos y sistemas, resultando en una disminución de la resistencia al estrés en sus diferentes formas, así como una mayor incidencia de enfermedades asociadas a la edad²⁰⁸. En las últimas décadas se han propuesto una serie de teorías para definir la causalidad y los mecanismos subyacentes del envejecimiento. Actualmente, la más ampliamente aceptada es la “hipótesis del estrés oxidativo” que modificó y avanzó la teoría de los radicales libres del envejecimiento, inicialmente postulada por Harman en 1956²⁰⁹. De acuerdo con la hipótesis del EOx el daño oxidativo no solo es provocado por la producción incontrolada de EROs, como se propone en la teoría de los radicales libres, sino también por otros oxidantes incluyendo las ERN. Más importante aún, en la hipótesis del EOx se enfatiza el papel esencial de las defensas antioxidantes como un componente crucial del equilibrio redox global del organismo, que no se consideró en la teoría original de los radicales libres²¹⁰. Se sugiere que la acumulación de este daño oxidativo con el tiempo contribuirá al deterioro del organismo relacionado con la edad. De esta manera, se espera que los factores que aumentan la producción de EROs aceleren el envejecimiento, mientras que los factores que se defienden contra las EROs, deben retrasarlo¹⁶⁴.

Las EROs influyen en numerosos procesos celulares relacionados con el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad²¹¹. De esta manera, las EROs inducen un daño oxidativo casual y acumulativo a macromoléculas que induciría una disfunción celular y, finalmente, muerte celular²¹². Las mitocondrias parecen estar estrechamente involucradas en el proceso de envejecimiento debido a que estos orgánulos se consideran la principal fuente intracelular de O_2^- , así como el principal objetivo del ataque de los radicales libres. Las EROs producidas por la cadena de transporte de electrones dañan los constituyentes mitocondriales, incluyendo proteínas, lípidos y ADN mitocondrial. Asimismo, la acumulación progresiva de mutaciones somáticas inducidas por oxidantes en el ADN mitocondrial durante la vida de un individuo conduce a un deterioro de la función bioenergética de las mitocondrias y contribuye al proceso de envejecimiento²¹³. Se ha propuesto un aumento del daño oxidativo durante el envejecimiento que induce al declive progresivo en la función celular y tisular como resultado de un suministro insuficiente de energía y/o una susceptibilidad incrementada a la apoptosis²¹⁴. El envejecimiento, además, se ha asociado a un estado de inflamación crónica de bajo grado, que junto al incremento del EOx, predisponen a la aparición de enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades de origen metabólico. Diferentes estudios han determinado la importancia del estilo de vida, y en particular de una dieta saludable, en el proceso del envejecimiento. De

hecho, y tal como veremos más adelante, estos estudios han demostrado la existencia de la relación entre la ingesta de grasas en la dieta, el envejecimiento y el EOX²¹⁵.

Dado que los mecanismos moleculares relacionados con el desarrollo de enfermedades metabólicas y aquellas relacionadas con el envejecimiento son muy similares, la comprensión de las bases y vías implicadas en el proceso de envejecimiento podría ser útil para una mejor comprensión del proceso global de la enfermedad²¹⁶.

4. COENZIMA Q₁₀

La Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀), 2,3-dimetoxi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzoquinona, también conocida como Ubiquinona o Coenzima Q, es una benzoquinona liposoluble presente en la mayoría de las células eucariotas, principalmente en las mitocondrias²¹⁷. La Q se refiere al grupo químico quinona, y el 10 al número de subunidades isoprenoides que contiene²¹⁸. La porción benzoquinona de la CoQ₁₀ se sintetiza a partir de tirosina, mientras que la cadena isoprenoide se sintetiza a partir de acetyl-CoA a través de la ruta del mevalonato (esta ruta también se utiliza en los primeros pasos de la biosíntesis del colesterol)²¹⁹. La CoQ₁₀ fue aislada y caracterizada por Festenstein y cols., en 1955, pero no fue hasta el año 1957 cuando Crane y cols.²²⁰ establecieron que se trataba de un compuesto miembro de la cadena respiratoria mitocondrial participando en la respiración celular aeróbica, generando energía en forma de ATP²²¹. Sin embargo, hoy día se sabe que la molécula de CoQ₁₀ está localizada en el dominio hidrofóbico de la bicapa lipídica de todas las membranas celulares²²² incluida la membrana plasmática y que, además, actúa como un importante antioxidante intracelular. La CoQ₁₀ protege a los fosfolípidos y a las proteínas de la membrana mitocondrial, y al ADN del daño oxidativo que acompaña a la peroxidación lipídica¹⁵⁷. Estudios en modelos animales han demostrado el efecto protector del CoQ₁₀ cuando éste es suplementado en la dieta, en cuanto a que atenúa las alteraciones oxidativas, con menores niveles de daño oxidativo al ADN²²³.

Debido tanto a su capacidad de transferencia de electrones y, por su acción como un antioxidante, la CoQ₁₀ se utiliza como suplemento dietético²²⁴. Estudios recientes han demostrado que las propiedades antioxidantes de la CoQ₁₀ son beneficiosas para la función cognitiva y la longevidad en modelos animales²²⁵. Recientemente hemos demostrado que el consumo de una dieta Mediterránea suplementada en CoQ₁₀, durante 4 semanas, reducía el EOX y la inflamación en personas de edad avanzada²²⁶. Actualmente ha relacionado el efecto del CoQ₁₀ en el tratamiento de otras patologías tales como el cáncer, la migraña o la HTA²²⁷.

5. PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA

Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) son un grupo heterogéneo y complejo de compuestos que se forman cuando los azúcares reducidos reaccionan de una manera no enzimática con aminoácidos, proteínas así como otras macromoléculas (lípidos y ácidos nucleicos), a través de la reacción de Maillard²²⁸. Este proceso ocurre de manera endógena (dentro del organismo) y exógena (mediante su ingesta a través de la dieta o tabaco entre otros). Esta reacción ha sido estudiada desde hace años en la industria alimentaria, ya que sus productos proporcionan un color y un sabor agradable y adictivo en los alimentos. Sin embargo, el estudio de los AGEs, *in vivo*, ha recibido una atención creciente en los últimos años debido a la asociación de los mismos con ciertas enfermedades crónicas, como la DMT2, la ECV, enfermedad renal y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, así como con el proceso de envejecimiento²²⁹.

5.1. Formación de los AGEs. Mecanismos de acción

La formación de los AGEs a través de la reacción de Maillard se produce en tres fases. En primer lugar, la glucosa se une a un aminoácido libre (principalmente lisina y arginina) de una proteína de una manera no enzimática para formar una base de Schiff (**Figura 2**)²³⁰. Una base de Schiff es un compuesto que tiene un carbono a nitrógeno de doble enlace en el que el nitrógeno no está conectado a hidrógeno. El inicio de este primer paso depende de la concentración de glucosa y tiene lugar en un par de horas. Si la concentración de glucosa disminuye, esta reacción es reversible²³¹. Durante la segunda fase, la base de Schiff se somete a una reordenación química durante un período de días y forma los productos de Amadori (también conocidos como productos de glicación temprana). Los productos de Amadori son compuestos más estables (la hemoglobina A1c es la más conocida), pero la reacción es aún reversible²³². Si hay acumulación de productos de Amadori, se someterán a un complicado reordenamiento químico (oxidaciones, reducciones e hidrataciones) y forman proteínas reticuladas.

Este proceso se lleva a cabo en semanas o meses y es irreversible. Los productos finales de color marrón se llaman AGEs y algunos de ellos tienen propiedades fluorescentes. Además de la reacción de Maillard, otras vías pueden también formar AGEs. Por ejemplo, la autooxidación de glucosa y la peroxidación de lípidos en derivados de dicarbonilos por un incremento del EOX es otra vía descrita para la formación de AGEs²³⁴. Estos compuestos pueden interactuar con los monoácidos y formar AGEs. El otro mecanismo bien estudiado para la formación de AGEs es la vía de los polioles, donde la glucosa se convierte en sorbitol por la enzima aldosa reductasa y después a fructosa por la acción del sorbitol deshidrogenasa²³⁵.

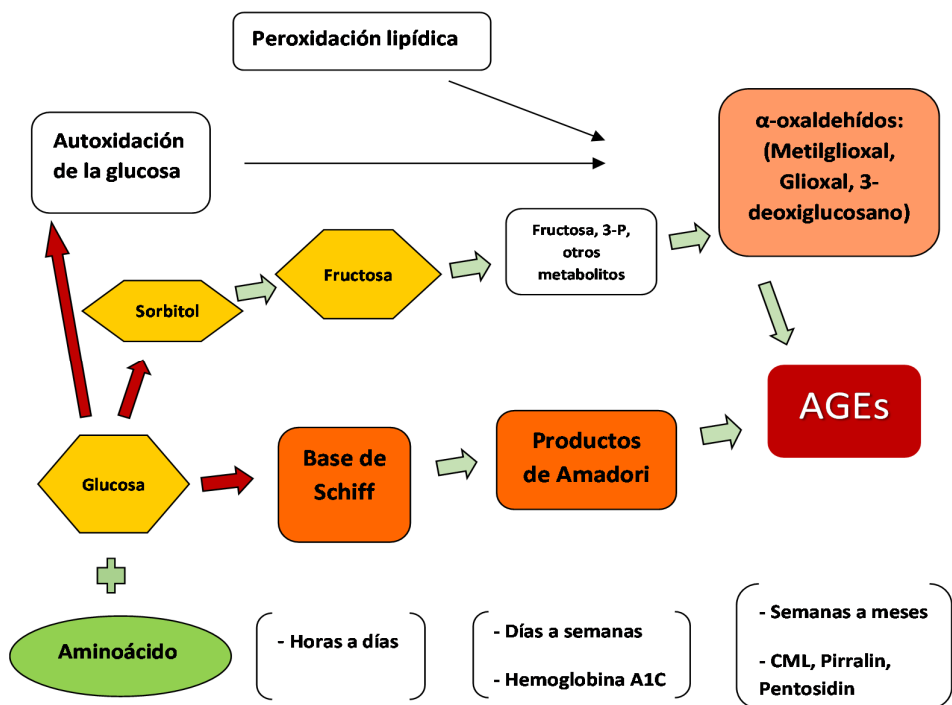


Figura 2. Esquema general de la formación de AGEs²³³.

A pesar de que el calor es usado para el tratamiento de los alimentos en la mejora de su seguridad, biodisponibilidad y propiedades organolépticas, el recalentamiento de alimentos también puede provocar la degradación de proteínas y otras reacciones de deterioro²³⁶. El tratamiento térmico en algunos alimentos resulta en la promoción de la reacción de Maillard, que añade un agradable sabor, color y aroma. En la industria alimenticia, la reacción de Maillard ha sido utilizada para la producción de caramelo, la torrefacción del café y la preparación del pan entre otros. Además, algunos de los productos de la reacción de Maillard se pueden añadir a los productos industrializados como sodas y zumos entre otros²³⁷.

Hay evidencia creciente de que la dieta occidental es una fuente abundante de AGEs exógenos. El contenido de AGEs de la dieta depende de la composición de los nutrientes siendo los alimentos ricos en proteínas y grasa tienen el contenido más alto, así como del modo de procesamiento de los alimentos^{238, 239}. La formación de los AGEs se puede acelerar rápidamente al aumentar el tiempo y la temperatura durante el proceso de cocinado (**Figura 3**)^{236, 238}.

5.1.1 Sistemas de defensa y eliminación de AGEs

Los niveles endógenos totales de AGEs de un organismo son dependientes tanto de la producción endógena, la ingesta exógena (principalmente a través de la dieta), como del aclaramiento renal y enzimático, que en conjunto producen aumentos transitorios y disminuyen

los niveles de AGEs en suero o plasma. Varias enzimas y receptores para estas glicotoxinas han demostrado formar parte de un sistema de desintoxicación y la contrarregulación contra los efectos prooxidantes de glicación²⁴⁰. Además, la excreción renal elimina el exceso de producción de AGEs en condiciones fisiológicas.

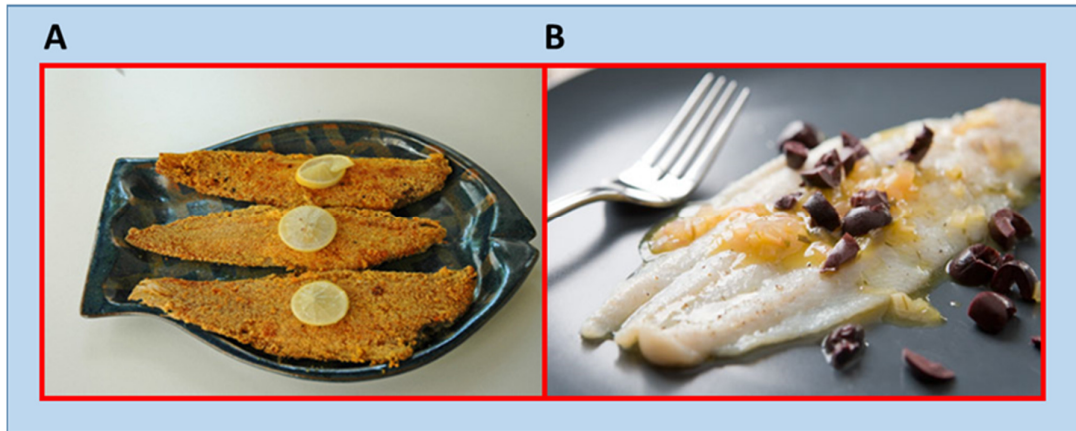


Figura 3. Ejemplo visual de cómo el método de cocinado afecta a la formación de AGEs. A) Método de cocinado que favorece la generación de AGEs, y B) Método de cocinado que protege la formación de AGEs.

Los sistemas de defensa para mantener la homeostasis de los AGEs incluyen a las defensas innatas, la degradación enzimática, la depuración renal y la degradación y captación celular mediada por receptor. La defensa innata contra los AGEs incluye la pigmentación de la piel, la quelación de los metales redox y la conformación estructural de las enzimas que protegen sitios reactivos²⁴¹. Los múltiples beneficios del microbioma intestinal podrían también incluir la metabolización de los AGEs exógenos. Las enzimas que deglicosilan las proteínas en la primera o segunda etapa de la reacción de Maillard o reducen dicarbonilos incluyen la fructosamina 3 kinasa, amadoriasa (fructosamina oxidasa), la 2 oxoaldehído reductasa y la carbonilo reductasa. Se ha descrito un sistema de receptores para AGEs que participan, de manera general, en la captación celular frente a los AGEs (y que explicaremos más adelante con detalle): AGER1, receptor que neutraliza los efectos tóxicos de los AGEs en el organismo, mientras que RAGE, al unir AGEs, desencadena la respuesta inflamatoria, fomentando el EOX²⁴². Las enzimas que degradan los AGEs incluyen el sistema de las glioxalases, principalmente glioxalasa I (GloxI) y glioxalasa II, aldoreductasas y aldehído deshidrogenasas. Particularmente, GloxI cataliza el metabolismo de dicarbonilos y previene su unión con proteínas para formar AGEs^{240,243}. La depuración renal incluye los mecanismos de filtración, reabsorción y secreción tubular para llevar a cabo la eliminación de los AGEs²⁴⁴.

Los AGEs ingeridos a través de la dieta se encuentran en los alimentos que la componen y son similares a los encontrados en los animales o tejidos humanos, compartiendo propiedades bioquímicas, inmunoquímicas y moleculares²⁴⁵. Los AGEs pueden promover la generación de nuevos AGEs y EROs, agotar los sistemas antioxidantes y provocar la secreción de mediadores inflamatorios²⁴⁵. La principal forma de evaluación y cuantificación de los AGEs se basa en inmunoensayos sensibles para ciertos AGEs, como la carboximetil-lisina (CML) o el metilglioxal (MG) derivado de hidroimidazolona, que han sido caracterizados mediante cromatografía líquida de alta presión, cromatografía de gases y espectrometría de masas²⁴⁵. Estos productos no son los únicos ni los más prevalentes AGEs, pero son los más comunes *in vivo* y se correlacionan positivamente con oxidantes nativos, tales como 8-isoprostanos o sus actividades^{243, 245, 246}. CML es considerado una de las formas más importantes de AGEs²⁴⁷. Dicha molécula puede conducir a la formación de compuestos dicarbonilos altamente reactivos que reaccionan con proteínas y propagan la formación de enlaces cruzados intra o intermoleculares²⁴⁸. MG es un metabolito intermedio, precursor en el metabolismo de los AGEs, y altamente reactivo que se forma espontáneamente durante la glucólisis como resultado de la transformación de fosfatos de triosa²⁴⁹. Esta molécula también se puede formar durante diversos procesos metabólicos, incluido el metabolismo de la acetona durante la lipólisis²⁵⁰. MG puede reaccionar con proteínas selectivas para producir AGEs, lo que conduce a la reticulación y desnaturalización de la proteína²⁵¹.

La principal entrada de los AGEs en el organismo, de manera exógena, es el tracto gastrointestinal y su principal salida es el riñón. Debido a su capacidad para conservar y también para distinguir los productos útiles de los tóxicos, ya sea desde el ambiente externo o interno, el riñón es, sin duda, un actor importante en la detoxificación de los AGEs, tanto por filtración (es el caso de la CML) o por absorción y secreción activa (es el caso del MG), dos procesos que dan lugar a la excreción neta de AGEs en la orina²⁵²⁻²⁵³. Como consecuencia de su gran aporte de sangre, los riñones están directamente expuestos a una mayor cantidad circulante de AGEs que otros órganos, lo cual los hace vulnerables a las lesiones mediante la circulación de carbonilos reactivos y EROs²⁵⁴. Este proceso puede ser la base de la reducción precoz del aclaramiento de AGEs documentado en ratones y en pacientes con DMT2, antes de que ocurran alteraciones reconocibles en la función renal²⁵⁵. Cualquier reducción en el aclaramiento renal puede causar potencialmente una acumulación de AGEs en el organismo, que a su vez conlleva a un aumento en la formación de nuevos AGEs y en los niveles de ROS, tanto en tejidos renales como extrarrenales.

5.2. Receptores de los AGEs

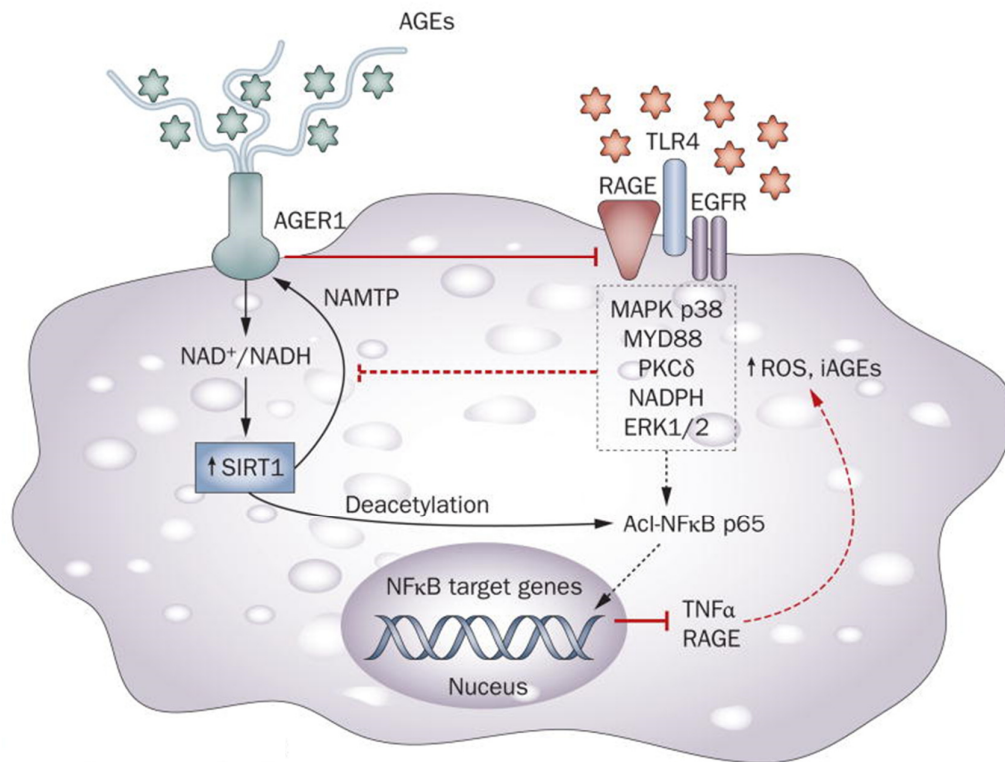
La dilucidación de las interacciones de los AGEs con los receptores ha demostrado ser complicada. En primer lugar, los receptores tienen una afinidad de unión relativamente baja. En

segundo lugar, los ligandos tienen una alta versatilidad en términos de estructura o carga. En tercer lugar, los AGEs pueden señalar a través de receptores no AGE, tales como receptores *scavenger*, receptores acoplados a proteínas G, receptores de reconocimiento de patrones y TLRs, así como a través de vías independientes del receptor. Además su modo de acoplamiento no se conoce completamente.

Además de los receptores de los AGEs más conocidos que se describen a continuación, muchos otros receptores interactúan con AGEs, incluyendo el receptor *scavenger* clase A tipo 2 (SCARB2), glicoproteína plaquetaria 4 (CD36), AGER3 (codificada por el gen LGALS3) o proteínas solubles que se conoce que forman parte de las defensas antimicrobianas, tales como lisozima y defensinas (**Figura 4**)²⁵⁶.

5.2.1. AGER1

Representa la defensa contra la toxicidad de los AGEs y está codificado por el gen DDOST, el cual es una proteína transmembrana tipo 1 conservada evolutivamente, implicada en



la síntesis de proteínas, la renovación de las ROS y la supervivencia celular^{257,258}. Esta proteína de unión a los AGEs está presente en la mayoría de las células, incluyendo macrófagos y células mononucleares, y media la captación, degradación y eliminación de AGEs en células y tejidos²⁵⁹.

Figura 4. Principales receptores que median la respuesta a su unión a AGEs²⁶⁰.

El AGER1 impide la acumulación de estas moléculas en el medio extracelular y el citoplasma, lo que bloquea la generación de EROs y nuevos AGEs promovidos por otros receptores [receptor para AGEs (RAGE), TLR4, receptor del factor de crecimiento epidérmico, CD36 o por mecanismos no receptores (**Figura 4**)²⁵⁶.

En los seres humanos, los niveles séricos de AGER1 se correlacionan inversamente con los AGEs intracelulares y directamente con los AGEs en orina²⁴³. Esta relación limita una serie de procesos de desestabilización celular inducidos por los AGEs. Por lo tanto, AGER1 inhibe la activación de las subunidades de NADPH oxidasas, p47^{phox} y gp91^{phox}, suprimiendo Tyr311 y Tyr332 y la fosforilación de PKC δ ²⁶¹. Esta acción impide la activación y la translocación nuclear de NF- κ B p65²⁶¹ y de las respuestas de los AGEs que son promovidas por el RAGE²⁶² (receptor antagonista de AGER1 que explicaremos a continuación). Además, AGER1 inhibe la fosforilación en residuos de serina de la isoforma p66Shc, inducida por AGEs, una proteína adaptadora principal que promueve el EOX y la apoptosis ²⁵⁸. Este proceso merece especial atención, ya que los niveles aumentados de p66Shc están relacionados con la DMT2, la arteriosclerosis y la enfermedad renal²⁶³.

Se ha identificado una sinergia protectora potencialmente relevante entre AGER1 y la proteína Sirtuina 1 (SIRT1). De las numerosas sirtuinas, se cree que SIRT1 desempeña un papel importante en la señalización y secreción de insulina, resistencia a la insulina, inflamación así como en la longevidad²⁶⁴. Se ha descrito que la sobreexpresión de AGER1 bloquea la supresión inducida por AGE de SIRT1 a través del NAD⁺/NADH inhibiendo la hiperacetilación del NF κ B p65 y los eventos inflamatorios en monocitos y células positivas para triptófano-5-hidroxilasa 1, enzima implicada en la síntesis de serotonina. Además AGER1 previene la señalización inducida por AGE a través del receptor de insulina y de la proteína sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) en adipocitos. Esta acción impide una disminución en la captación de glucosa por adipocitos *in vitro* e *in vivo*, inducida por AGEs. Estos datos sugieren que AGER1 proporciona un escudo frente a una elevada carga oxidante externa, ayudando así a mitigar la inflamación y preservar las acciones metabólicas de la insulina. El hecho de que los niveles de AGER1 en células mononucleares periféricas aisladas de seres humanos sanos sean sensibles y correlacionados con los niveles de AGEs circulantes apoya esta perspectiva²⁴³.

Después de largos periodos de exposición a elevados niveles de AGEs, como en pacientes con DMT2 y enfermedad renal crónica, la expresión de AGER1 (tanto a nivel de gen como de proteína) disminuye²⁴³. Esto conlleva a un aumento en las concentraciones de AGEs y EROs, alimentándose en un ciclo de formación de nuevos AGEs y, en consecuencia, un aumento del EOX. Aunque la causa de la regulación negativa del AGER1 en la diabetes no es evidente, este efecto es reversible por el consumo de una dieta restringida en AGEs tanto en ratones como humanos^{243,255}. Los niveles del SIRT1 también son restaurados por restricción de los AGEs, un

hecho que subraya la interdependencia de estas dos vías. En resumen, los niveles de expresión de AGER1 se correlacionan positivamente con los niveles de otros mecanismos antioxidantes intracelulares por ejemplo, SIRT1, Nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT), SOD2, GSH y negativamente con las vías pro-oxidantes (RAGE, NADPH oxidasa, p66Shc). Si AGER1 es importante en el mantenimiento de la homeostasis normal, entonces los niveles reducidos de expresión de AGER1 pueden indicar un compromiso en las defensas del huésped. Del mismo modo, la restauración oportuna de los niveles de AGER1 también puede promover la recuperación de otras defensas nativas importantes, una hipótesis que queda aún por establecer.

5.2.2. RAGE

Este receptor para AGEs representa el activador pasivo de la inflamación (**Figura 4**). Su acción propaga el efecto de EROs y la inflamación en enfermedades agudas y crónicas^{265,266}, siendo capaz de unirse a los AGEs circulantes. A medida que las defensas del huésped disminuyen debido a un exceso crónico de oxidantes del medio ambiente, los AGEs se acumulan en los distintos tejidos y células del organismo. El resultado es un incremento sostenido del EROx y de la respuesta inflamatoria, que conduce a una lesión celular. Este cambio sostenido en la homeostasis podría subyacer el aumento de la susceptibilidad a la DMT2 y sus complicaciones. RAGE es miembro de una familia de receptores de reconocimiento de patrones de baja afinidad que funcionan en la interfase de la inmunidad innata y adaptativa y enlazan múltiples ligandos, incluyendo la proteína B1 (HMGB1) del grupo de alta movilidad, la proteína β amiloide y los miembros del enlace de calcio de S100²⁶⁷. Las condiciones de unión de los AGEs con relación a estos otros ligandos, en el inicio de eventos de señalización *in vivo*, no son bien comprendidas e incluso debatidas²⁶⁸.

Por otro lado, la activación de RAGE induce una serie de eventos de señalización, incluyendo a la vía de las MAP quinasas (MAP p38-JNK y JAK-STAT) que son resultado, así como la causa, de un aumento en la generación y niveles de las EROs (**Figura 5**). Esta aparente redundancia podría ser en parte debido a la diversidad de ligandos del RAGE u otros tipos de células implicadas y en parte debido a la interacción del RAGE con otros receptores, tales como TLR4. Una serie de trabajos sugieren que los niveles de TLR2 y TLR4 están elevados en pacientes con DMT2 y que interactúan con AGEs, ya sea directamente o a través del RAGE y otros ligandos como el HMGB1²⁶⁹. Cabe destacar que las células inflamatorias y vasculares con TLR4 ausentes o defectuosos carecen de la respuesta inflamatoria típica de los AGEs. Aunque numerosos estudios indican la asociación entre el RAGE y las complicaciones diabéticas, con o sin la participación de TLR4, ha sido difícil asignar un papel primario a este receptor que no sea el de un transductor de EROs de amplio espectro.

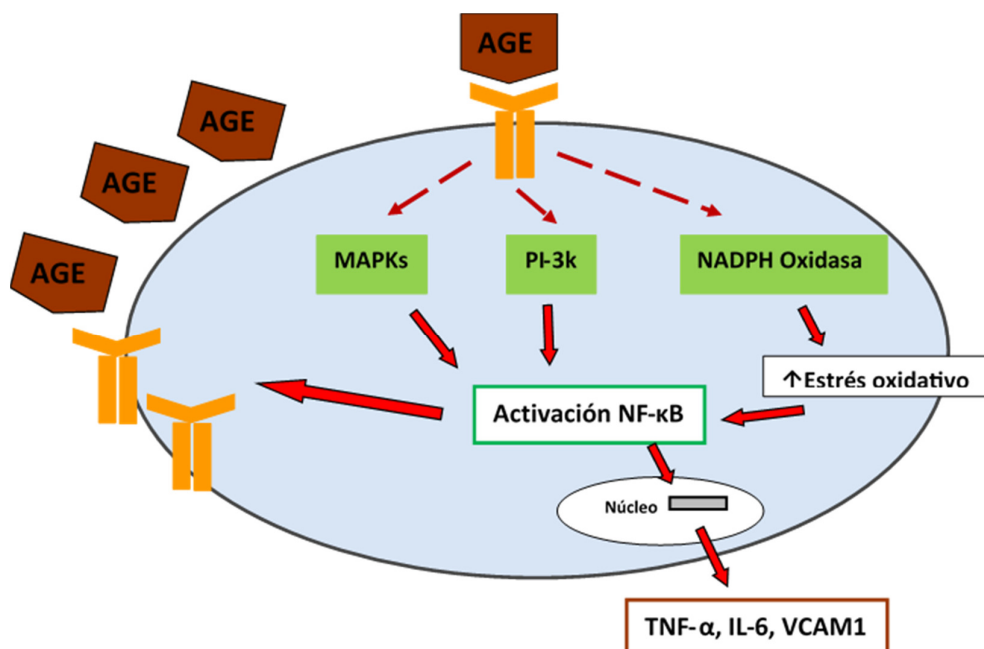


Figura 5. Mecanismos de acción de los AGEs a nivel celular²³³.

Se ha descrito que el EOX (exógeno o intracelular) puede ejercer como biomodulador general del RAGE, excepto cuando el RAGE es manipulado genéticamente²⁷⁰. Por lo tanto, una disminución en el EOX basal mediante la simple restricción de la disponibilidad externa de los AGEs es suficiente para suprimir tanto su expresión génica como los niveles de proteína en ratones diabéticos o en el envejecimiento^{255,271}. De forma similar, la restricción de los AGEs reduce los niveles de RAGE en células mononucleares de sangre periférica en personas sanas y en aquellas con DMT2 a niveles claramente por debajo de su línea basal (> 60%) lo que indica que el RAGE se regula fácilmente por AGEs en el medio externo²⁴³. Cabe destacar que los niveles de expresión génica de RAGE y proteínas en células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos se correlacionan directamente con los niveles séricos de AGE y EOX, así como con niveles de AGE ingeridos²⁴³, mientras que sólo están moderadamente elevados en pacientes con diabetes mellitus sin comorbilidades.

Como ocurre con otras moléculas de transducción de señales que regulan eventos proinflamatorios, la regulación positiva *in vivo* de RAGE puede ser un resultado más que una causa de un mayor EOX. Una vez que las defensas del huésped, incluyendo el AGER1, están comprometidas y el EOX basal aumenta, el RAGE sobreexpresado puede amplificar y perpetuar esta condición.

5.3. AGEs y patologías asociadas

5.3.1. *Síndrome Metabólico*

La exposición crónica a una dieta con elevado contenido en AGEs promueve la inflamación crónica y el EOx, lo cual predispone al desarrollo de SMet²⁶⁰. Se ha encontrado que niveles elevados de MG y CML están fuertemente ligados a niveles suprimidos de las defensas innatas tales como SIRT1 o el AGER1 en pacientes con SMet²⁵⁹. De hecho, existen datos que identifican al MG como un factor de riesgo modificable para el desarrollo de SMet, posiblemente actuando a través de la supresión del SIRT1 así como otras defensas del huésped, promoviendo un mayor daño oxidativo crónico e inflamación²⁴¹. En un estudio publicado recientemente, se pretendió evaluar la asociación entre los AGEs consumidos a través de la dieta y el riesgo de SMet. Para ello se llevó a cabo un diseño transversal en una población de 5848 sujetos, de edades entre 19-70 años, en el que se determinó el consumo diario de CML empleando un cuestionario de frecuencia alimentaria semi-cuantitativa validado. Aquellos sujetos con un mayor consumo en CML a través de la dieta presentaron una mayor obesidad abdominal, hipertrigliceridemia y, por tanto, un mayor riesgo de desarrollar SMet²⁷². Además, en un ensayo clínico y aleatorizado de 138 pacientes con SMet, 77 recibieron una dieta restringida en AGEs y 61 pacientes consumieron una dieta con alto contenido de los mismos, durante un año. Se observó que aquellos pacientes con restricción dietética de AGEs, presentaron una mejoría en diferentes factores de riesgo de SMet en comparación con aquellos pacientes que consumieron una dieta rica en AGEs. Igualmente, estos pacientes mostraron un aumento en la expresión génica de SIRT1 y AGER1, una disminución en diferentes parámetros relacionados con la resistencia a la insulina así como una disminución del EOx y la inflamación.²⁰⁰⁻²⁷³.

5.3.2. *Diabetes Mellitus tipo 2*

La hiperglucemia aumenta el proceso de glicación y es especialmente evidente en los tejidos independientes de la insulina, como los glóbulos rojos, las células del tejido nervioso periférico, las células endoteliales, las células oculares y las células renales²⁷⁴. La hemoglobina glicada A1c (hemoglobina A1c) es el producto de glicación temprana más ampliamente reconocido, y también se utiliza como indicador del manejo de la glucosa en la sangre en personas con diabetes. También se plantea la hipótesis de que la glicosilación de las enzimas proteolíticas en la diabetes reduce la eficacia de la acción de la insulina, dando lugar a una mayor acumulación de productos finales glicosilados²⁷⁴. También se ha descrito la implicación de los AGEs en la cicatrización de las heridas tardía asociada con la diabetes, presumiblemente a través de modificaciones metabólicas vasculares, neurológicas o intermedias²⁷⁵.

La formación y acumulación de AGEs está exacerbada en condiciones diabéticas, e incluso si se restaura el control glucémico, los AGEs pueden permanecer en los tejidos de sujetos diabéticos durante mucho tiempo. Las complicaciones diabéticas ocurren en ambos tipos de diabetes, DMT1 y DMT2, y en general, hay evidencia de que los AGEs, que se acumulan en los tejidos y el suero/plasma, están asociados con dichas complicaciones²⁷⁶. En relación a la DMT2, diferentes estudios indican una correlación positiva entre los AGEs y complicaciones diabéticas, incluida la retinopatía diabética²⁷⁷, la nefropatía²⁷⁸ y la ECV²⁷⁹. Existen estudios que indican que los AGEs derivados de la dieta incrementan el riesgo de resistencia a la insulina. *Cai y col* sugieren que una dieta rica en MG suministrada durante 4 semanas a ratones C57BL6 no obesos condujo al aumento de peso, adiposidad y al desarrollo de resistencia a la insulina de los mismos²⁴¹. Además, esta ingesta crónica de AGEs ocasionó un incremento del EOX e inflamación. En este contexto, otro estudio demostró que la restricción de AGEs en una cohorte de pacientes con DMT2 mejoró el estado de resistencia a la insulina y aumentó la expresión de SIRT1 y AGER1²⁸⁰.

5.3.3. Enfermedad cardiovascular

La acumulación de los AGEs *in vivo*, a lo largo del tiempo, contribuye a cambios en la estructura y función del sistema cardiovascular y se presenta como rigidez arterial, alteraciones en la relajación miocárdica, formación de placa de ateroma y disfunción endotelial. Uno de los mecanismos propuestos para dichos cambios implica la reticulación adicional sobre el colágeno (cuya estructura normal ya contiene reticulación) mediante la glicación de sus aminoácidos libres. El entrecruzamiento del colágeno con los AGEs producirá rigidez en los vasos sanguíneos. Otro mecanismo por el cual los AGEs ejercen daño al sistema cardiovascular es la reducción de la absorción de las LDL por los receptores celulares. Esto ocurre a través de la glicación de la partícula LDL en la apolipoproteína B y en los componentes fosfolipídicos de la LDL. La LDL glicosilada es más susceptible a la reticulación con el colágeno en la pared arterial que las LDL no glicosiladas, y no es absorbida por la célula y se acumula²⁸¹. La captación de macrófagos de estas LDL modificadas conduce a la formación de células espumosas y al desarrollo de la placa de ateroma²⁸². Además, la disminución de la activación del ON es otro mecanismo descrito por los AGEs que dañan el sistema cardiovascular. La biosíntesis de ON (por sus propiedades vasodilatadoras) en el endotelio contrarresta algunos de los mecanismos para el desarrollo de la arteriosclerosis. Algunos autores han propuesto que los AGEs reducen la actividad de la eNOS en el endotelio²⁸³. La administración a largo plazo (24-30 semanas) de aminoguanidina (un inhibidor de la formación de AGEs) mostró la prevención de la hipertrofia cardíaca y de la rigidez arterial en pacientes normotensos²⁸⁴. También se ha demostrado que el CM puede servir como predictor de mortalidad cardiovascular. En este sentido, *Semba y col.* estudiaron un grupo de 559 mujeres, de 65 años de edad, durante 4,5 años

del Estudio de Salud y Envejecimiento de la Mujer (WHAS I), donde mostraron que aquellas mujeres con mayores niveles de CML (en cuartiles superiores de CML) presentaron un mayor riesgo de mortalidad asociada a ECV²⁸⁵. En las lesiones arterioscleróticas, CML estaba presente en las células infiltrantes, lo que sugiere un papel importante en el desarrollo de lesiones vasculares por la glicosilación de las fibras de elastina²⁸⁶.

5.3.4. Nefropatía diabética y enfermedad renal

La relación entre la enfermedad renal y los AGEs ha sido ampliamente estudiada en pacientes con DMT2, y en menor medida en las poblaciones de edad avanzada. *Semba y cols* sugirieron que en una población de hombres y mujeres (>65 años, n = 1008), concentraciones elevadas de AGEs circulantes podían usarse como marcador independiente de la función renal²⁸⁷. De esta manera, niveles elevados de CML se asociaban independientemente con la tasa de filtrado glomerular estimada (índice de función renal), tanto al inicio y como a los tres y seis años de seguimiento. En 548 mujeres del Estudio de la Salud de la Mujer y el Envejecimiento (Estudio I en Baltimore), el 51,6% presentó una disminución de la tasa de filtrado glomerular, la cual se asoció con un incremento de los niveles séricos de CML y RAGE²⁸⁸. Por otro lado, se ha sugerido que los niveles elevados de AGEs y la inflamación crónica en los pacientes con DMT2 predisponen al desarrollo de nefropatía diabética²⁸⁹. La asociación entre elevados niveles de MG y la progresión de nefropatía diabética fue confirmada en un estudio longitudinal en niños con DMT1 cuyo seguimiento incluyó una biopsia renal²⁹⁰. Otro estudio observó que niveles altos del receptor del TNF α precedían al desarrollo de la enfermedad renal crónica, tanto en DMT1 y 2. Estos datos fueron confirmados en un ensayo clínico con 106 individuos no obesos con DMT2, donde se encontró que los niveles del receptor del TNF α se asociaban con el desarrollo de la enfermedad renal crónica^{291,292}. *Vlassara y col* encontraron resultados similares en un estudio con 325 participantes sanos y 66 pacientes con enfermedad renal crónica. Los niveles séricos de CML y MG fueron más elevados en aquellos pacientes con enfermedad renal crónica, en comparación con los participantes sanos, donde además se correlacionaron negativamente con la tasa de filtrado glomerular²⁴³.

5.3.5. Envejecimiento

Previamente hemos establecido el importante papel del EOX durante el proceso del envejecimiento y del aumento de la incidencia de enfermedades metabólicas, cardiovasculares y renales. Ya que los AGEs son glicotoxinas con un alto carácter oxidante, recientemente se ha establecido su relación con el envejecimiento. En un estudio reciente, se examinaron los niveles de AGEs y el grado de EOX en 345 adultos sanos, entre 18 a 45 años, comparados con aquellos > 60 años²⁴³. El estudio mostró que los niveles séricos de CML y MG fueron más elevados en participantes sanos mayores de 60 años, que en los participantes jóvenes, y se correlacionaron

independientemente con los AGEs consumidos a través de la dieta. Uno de los hallazgos más importantes en este estudio fue que la reducción de la ingesta dietética de AGEs disminuyó significativamente el grado de EOx, independientemente de la edad, lo que sugiere que el aumento del EOx no se correlaciona de forma obligada con el envejecimiento, que la reducción de AGEs en la dieta podría ser una intervención segura y eficiente en el envejecimiento normal, y que este hecho podría mejorar, retrasar o incluso prevenir el desarrollo de las enfermedades relacionadas con la edad. Algunos autores han propuesto que el desequilibrio redox que se produce durante el envejecimiento puede deberse a un aumento de la producción endógena de AGEs, o a un aumento de la ingesta exógena que, en combinación con una disminución del aclaramiento renal de los mismos, conduce a la acumulación de AGEs observada en personas de edad avanzada^{240,293}.

6. ENDOTOXEMIA

6.1. LPS (Lipopolisacárido)

El lipopolisacárido (LPS) es un importante componente de la membrana externa de las bacterias Gram (-). Está constituido por una parte lipídica y por cadenas de oligosacáridos o polisacáridos²⁹⁴. Es una molécula altamente pro-inflamatoria que participa en la adhesión de las bacterias a las células epiteliales²⁹⁵. Se compone de dos regiones principalmente, un glucolípido llamado lípido A y un heteropolisacárido conocido como el núcleo unidos entre sí por el azúcar ácido 2-keto-3-deoxioctanato (KDO)²⁹⁶.

- El lípido A se le reconoce como la fracción biológicamente activa de la molécula, se trata de un disacárido (glucosamina) unido a ácidos grasos que por lo general son ácido caproico, láurico, mirístico, palmítico y esteárico los cuales están insertos en la membrana externa de la bacteria²⁹⁷. Es la endotoxina bacteriana, y es el responsable del desencadenamiento de la respuesta inmunitaria en el sujeto infectado y, por tanto, de la fiebre y el malestar²⁹⁸.
- El núcleo se divide en dos partes: una región interna, compuesta por heptosas, ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico (KDO) y L-glicero-D-manoheptosa (Hep), y una externa, formada por hexosas (glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina)²⁹⁹.

En algunas bacterias, el LPS presenta una región adicional denominada el antígeno O, que permite clasificar a las especies que lo poseen en serogrupos y que actúa como receptor para muchos bacteriófagos³⁰⁰. Así mismo, evita el reconocimiento del lípido A por parte de los macrófagos del organismo. Desde su descubrimiento, fue reconocida como una molécula con una potente acción endotóxica. De hecho, posteriormente fue identificada como el principal responsable del shock inducido por bacterias Gram (-)³⁰¹. Otras funciones que desempeña son el

mantenimiento de la membrana externa, mimetismo molecular, inhibición de anticuerpos y variaciones antigénicas entre otras³⁰².

6.2. LPS como endotoxina

El intestino alberga en torno a 10 veces más bacterias que células tiene el organismo humano. En base a ello se ha estimado que en el lumen intestinal hay más de 1 gramo de LPS³⁰³, que es liberado de la membrana bacteriana como consecuencia de la multiplicación o lisis, y que puede atravesar la barrera intestinal y entrar en el torrente sanguíneo por 2 mecanismos fundamentalmente: 1) Ruta paracelular, atravesando la barrera intestinal a través de las uniones entre los enterocitos³⁰⁴. 2) Ruta transcelular, a través de las células epiteliales como resultados del reclutamiento del LPS por receptores e internalización por endocitosis³⁰⁵. Esta ruta está relacionada con la incorporación del LPS a los quilomicrones³⁰⁶.

Una vez el LPS entra en torrente sanguíneo, se une a varias proteínas, entre las que destaca la proteína de unión al LPS (LBP) y los receptores CD14, con los que forma el complejo de unión a TLR4 y MD2³⁰⁷. La proteína LBP es la encargada de capturar al LPS y formar el complejo LPS-LBP facilitando, de esta manera, la asociación del LPS con el receptor CD14³⁰⁸. El CD14 es una glicoproteína que se encuentra de forma soluble o anclada a la superficie celular de monocitos, macrófagos, polimorfonucleares y células endoteliales que no posee dominio citoplasmático y que tiene como función principal transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento³⁰⁹. La MD2 es una proteína soluble que se asocia con el receptor TLR4 para llevar a cabo la transducción del LPS³¹⁰. Una vez que se ha formado el complejo LPS-TLR4/MD2, el TLR4 sufre una oligomerización después de la cual se inicia una reacción que comienza con la interacción con proteínas celulares que poseen dominios receptores Toll de Interleuquina 1 (TIR), las cuales son las encargadas de mediar la relación entre el TLR4 y las proteínas celulares de transducción del LPS³¹¹. Existen cinco proteínas celulares utilizadas por el TLR4 que contienen dominios TIR.

Debido a la utilización de las proteínas con dominios TIR y sus productos finales (citoquinas proinflamatorias o interferones tipo I), la señal de transducción del LPS a través del TLR4 ha sido dividida en dos rutas, la vía dependiente de la proteína MyD88 y la vía dependiente de la proteína TRIF³¹². Cada una trasduce la señal por vías separadas que confluyen en la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B³¹³. En condiciones normales, este factor se encuentra en forma inactiva en el citoplasma unido al inhibidor del factor κ B, pero tras la señal enviada por las proteínas MyD88 o TRIF se activan quinasas del INF- κ B que lo separan del NF- κ B y lo activan³¹⁴. Una vez activo, se transloca al núcleo donde se une a la región promotora de los genes de respuesta inflamatoria generando como respuesta final la transcripción de interferones tipo I.

La estimulación del receptor TLR4, la producción de interferones tipo 1 y de citoquinas pro-inflamatorias inducen varios tipos de respuestas en el organismo tales como, aumento en la permeabilidad vascular, aumento en la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales, estimulación de la producción de nuevas citoquinas y quimiocinas, extravasación de neutrófilos para que migren a través del endotelio a los epitelios, activación del factor XII de la coagulación, la fibrinólisis y la vía clásica del complemento³¹⁵. Por ende, deben existir vías de inhibición de la señal de transducción del LPS que tiene como fin proteger al huésped del daño inducido por el LPS

El bloqueo de la señal emitida por el TLR4 puede ocurrir a través de proteínas de superficie celular o proteínas a nivel citoplasmático³¹⁶. A dicho nivel, se encuentran las proteínas Factor 1/4 asociado al receptor del TNF- α (TIRAF1 TIRAF4) y quinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK M) que inhiben al NF- κ B y a la proteína MyD88 respectivamente³¹⁷. Las proteínas RP105 (radioprotector 105), análogo del receptor IL-1 (ST2L) y la molécula relacionada con la inmunoglobulina 1 SIGIRR se expresan en la superficie de las células e inhiben directamente al receptor TLR4, a la proteína MyD88 y al TIRAP respectivamente³¹⁸. Cuando los mecanismos inhibitorios se agotan y prevalecen las respuestas inducidas por el LPS, los eventos mencionados pueden terminar en un shock endotóxico y fallo multiorgánico con la consiguiente muerte del huésped³¹⁹.

6.3. LPS como molécula de adhesión bacteriana

El papel del LPS en la adhesión a los epitelios ha comenzado a llamar la atención en cuanto a que no sólo actuaría como un potente inmunógeno sino que participaría activamente en el proceso de colonización y establecimiento de la infección en el huésped al ser la molécula que se encuentra en mayor proporción en la superficie bacteriana³²⁰. La adherencia de las bacterias a la superficie epitelial es un paso clave en la patogénesis de las infecciones bacterianas³²¹. La activación del LPS en la mediación de la adhesión a las células y tejidos fue reconocida por primera vez en bacterias de plantas. En 1973 *Maroudas* sugirió un papel similar en microorganismos que afectan a animales y desde entonces comenzó la investigación para discernir el papel del LPS en la adhesión bacteriana³²². Sin embargo, los mecanismos por los cuales ocurre esta acción no se conocen bien. Varios trabajos indican que en ausencia del LPS se inhibe la adhesión de las bacterias³²³. Otras investigaciones donde se modifican los niveles de expresión y la estructura del LPS señalan una disminución o inhibición de la adherencia en diferentes tipos bacterianos.

El proceso de adhesión bacteriana requiere de la expresión, exposición y acoplamiento de ligandos por parte de los microorganismos y de receptores de superficie sobre las células del huésped³²⁴. Los niveles de expresión de las mismas derivan en el estímulo o inhibición de la

adhesión de los microorganismos a los epitelios³²⁵. Para los LPS se sugiere que su papel en la adhesión bacteriana probablemente ocurre a través de interacciones físico-químicas más que a presencia de receptores sobre la superficie de las células del huésped³²⁶. Las hipótesis sugieren que la atracción entre los LPS y las células sería mediada por moléculas de agua (H₂O) o por proteínas presentes en las superficies epiteliales (líquido periciliar).

6.4. LBP (Proteína de unión a LPS)

Es una proteína plasmática de fase aguda, de síntesis hepática, cuya función principal es unirse al LPS a través del lípido A y presentarlo en forma monomérica a su receptor específico: la proteína de membrana CD14³²⁷. Aunque se han identificado diversas estructuras capaces de unir LPS, CD14 es la única responsable de mediar una función biológica³²⁸. Esta proteína se encuentra en dos formas: anclada a la membrana de las células mieloides a través de una unión glucosil-fosfatidil inositol o en forma soluble en el plasma. Una vez que se transfiere a la proteína CD14 se forma el complejo LPS-LBP, el cual se une a los receptores “toll like” 2 y 4 para inducir la síntesis de citoquinas de carácter pro-inflamatorio, como IL-6, IL-1 y TNF- α ³²⁹. Además, la LBP es capaz de neutralizar las endotoxinas bacterianas mediante la unión de los LPS a las lipoproteínas plasmáticas³³⁰.

Se ha descrito un papel dual para la acción de esta proteína cuando se une a LPS. Inicialmente se pensaba que bajos niveles plasmáticos de LBP estaban asociados a la potenciación del efecto inflamatorio del LPS mientras que altas concentraciones estaban asociadas a un efecto inhibitorio³³¹. No obstante, posteriores estudios mostraron que altas concentraciones de LBP parecen estar asociadas a infecciones bacterianas, más que a supresión de la señal inflamatoria del LPS³³².

7. ESTADO POSTPRANDIAL

El estado postprandial es la situación metabólica habitual en la que se encuentra el ser humano a lo largo del día, debido a la superposición de los productos absorbidos en las distintas comidas diarias, durante las cuales se producen modificaciones sucesivas en la concentración y composición de las lipoproteínas plasmáticas. En los países occidentales se consumen al menos 3 comidas diarias con un 20-70% de grasa, y el nivel máximo de TG ocurre entre las 3 y las 4 horas tras la ingesta, mientras que los niveles no vuelven al estado basal hasta las 8-12 horas³³³. El estado postprandial se caracteriza por un aumento en los niveles plasmáticos de TG y de las lipoproteínas ricas en TG (LRTs), constituidas por los quilomicrones intestinales, las partículas VLDL y posteriormente sus remanentes. Además las partículas de LDL se convierten en pequeñas y densas, y las HDL se catabolizan rápidamente³³⁴. Un incremento del tiempo de permanencia en el plasma de estas LRTs tiene efecto aterogénico al unirse al endotelio, lo que

activa las células endoteliales, promoviendo la síntesis de moléculas de adhesión y reclutando células inflamatorias³³⁵. De hecho, la capacidad de los individuos para regular el aclaramiento de los TGs es el reflejo de la eficiencia metabólica³³⁶, y el retraso en su aclaramiento representa una respuesta alterada que podría reflejar la presencia de resistencia a la insulina³³⁷.

Los factores genéticos y ambientales condicionan la variabilidad en la respuesta lipémica postprandial. Varios son los factores que pueden inducir cambios en esta respuesta, como la edad, el género, el tabaquismo, el ejercicio físico, los niveles de insulina, la obesidad abdominal, la actividad de las enzimas lipoproteína lipasa y lipasa hepática, los genes o el tipo de dieta.

7.1. Respuesta postprandial, inflamación y Síndrome Metabólico

Muchos de los conocimientos que se tienen hoy en día de la relación existente entre lípidos, metabolismo de las lipoproteínas y desarrollo de arteriosclerosis proviene de estudios realizados en situación de ayunas. Estos conocimientos son una base importante, pero no hay que olvidar que el ser humano se encuentra la mayor parte del día en estado postprandial, con una fluctuación continua del grado de lipemia a lo largo del día³³⁸.

Hay evidencias de la relación existente entre la hipertrigliceridemia postprandial, la resistencia a la insulina y la enfermedad coronaria, de manera que parece probable que los niveles de TG postprandiales sean un mejor predictor de enfermedad coronaria que los niveles de TG en ayunas¹²⁶. En pacientes con SMet existe una importante heterogeneidad en la respuesta a una sobrecarga grasa. El 53% de los pacientes con SMet presentan incrementos intensos (>100 mg/dl) en los TG tras la sobrecarga grasa, y el 50% de estos pacientes son hiperuricémicos³³⁹.

Estudios previos sugieren que la lipemia postprandial induce una disfunción endotelial que se acompaña de una respuesta inflamatoria aguda, de un estado pro-trombótico y de un aumento en los niveles de EOX, por lo que, existe un gran interés en conocer los cambios que se producen en el organismo durante el postprandio y la influencia que la cantidad y la calidad de la grasa de la dieta tienen sobre la respuesta postprandial^{340,341}. El comienzo del proceso arteriosclerótico es una alteración de la función endotelial desencadenada por varios factores de riesgo. Como indicaron *Vogel y cols*, un importante mecanismo para la alteración de esta función en la lipemia postprandial es el daño oxidativo³⁴². En un estudio reciente, *Pérez Martínez y cols* compararon el efecto postprandial de cuatro sobrecargas grasas³⁴³. Los autores demostraron que la sobrecarga rica en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) mejoraba el EOX postprandial medido como el cociente entre el glutatión reducido/glutatión oxidado.

Varios estudios han mostrado un descenso en el efecto negativo producido tras una sobrecarga grasa al administrar antioxidantes, lo que viene a corroborar la asociación entre actividad pro-oxidante y disfunción vascular. *Plotnick y cols* encontraron que en individuos sanos se prevenía la reducción en la vasodilatación mediada por flujo y dependiente del endotelio con el consumo

de vitamina C y E antes de una sobrecarga grasa (50 g)³⁴⁴. Además se sabe que la hipertrigliceridemia postprandial puede conducir a una disfunción endotelial asociada a una producción incrementada de O_2^- vascular y el consiguiente descenso de ON. Parece que las lipoproteínas postprandiales, particularmente los quilomicrones y las VLDL inducen la generación de radicales de oxígeno en la superficie endotelial que reaccionan con el ON, reduciendo su biodisponibilidad. En el estudio *Lipgene* se ha demostrado que el consumo de una dieta alta en MUFA mejora la función endotelial postprandial en individuos con SMet, respecto al consumo de ácidos grasos saturados (SFA) y de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3 de cadena larga y de origen marino (ácido eicosapentanoico, EPA, y docosahexanoico, DHA. En concordancia con estos resultados, la respuesta postprandial de la eNOS se incrementó con la ingesta de una dieta rica en MUFA comparado con las dietas alta en SFA y baja en grasa. Además, se objetivó un descenso de los niveles de ICAM-1 plasmáticos tras el consumo de MUFA respecto al consumo de SFA y de PUFA n-3³⁴⁵.

Por otro lado, se ha demostrado que la lipemia postprandial influye en el estado pro-trombótico, activado tras consumir un desayuno rico en grasa. No obstante, este proceso es susceptible de ser modulado por dieta como se ha demostrado en un estudio donde se observó que la activación postprandial del factor VII se ve disminuida al consumir de forma habitual un desayuno rico en aceite de oliva³⁴⁶. Estos resultados se podrían explicar por el hecho de que con el consumo de una dieta rica en MUFA se disminuyen los quilomicrones postprandiales, hecho que atenúa la activación del factor VII³⁴⁷. Otra explicación plausible podría basarse en el contenido fenólico del aceite de oliva, tal como se demostró en un estudio de *Ruano y cols* que concluyeron que el consumo de aceite de oliva con alto contenido en polifenoles mejoraba el perfil hemostático postprandial³⁴⁸. En este estudio se mostró que las concentraciones plasmáticas del factor VII y la actividad del PAI-1 eran menores tras el consumo de un desayuno rico en aceite de oliva con alto contenido en polifenoles comparado con un desayuno rico en aceite de oliva con bajo contenido en polifenoles.

Como se ha mencionado previamente, durante el estado postprandial se desencadena una respuesta inflamatoria aguda, y puesto que en la mayor parte del día nos encontramos en ese estado, es probable que dicha respuesta se mantenga, lo que conllevaría un aumento en los niveles de EROs, una mayor actividad de NF-kB y elevados niveles de citoquinas proinflamatorias³⁴⁹. Este hecho es importante debido a que en los pacientes con SMet subyace un estado de inflamación crónica de bajo grado³⁵⁰. De hecho, se ha mostrado que la trigliceridemia postprandial puede estar relacionada con el estado pro-inflamatorio caracterizado por un incremento en la expresión de marcadores de activación de monocitos¹²⁹. Esto es especialmente importante en los pacientes con SMet muestran una elevada trigliceridemia¹²⁷ y anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas en el postprandio¹²⁸. Esto último ha servido de

argumento para considerar al SMet una enfermedad postprandial. En definitiva, estas evidencias sugieren que es fundamental investigar los cambios metabólicos que se producen durante el periodo postprandial, así como el efecto que sobre el mismo ejercen diferentes modelos de alimentación.

8. PAPEL DE LA DIETA EN EL SÍNDROME METABOLICO Y EN EL PROCESO DEL ENVEJECIMIENTO

Una alimentación equilibrada forma parte esencial de un estilo de vida saludable. Además, otros elementos de la vida diaria, como el ejercicio físico, el consumo de tabaco o el estrés, influyen de forma significativa sobre nuestra salud³⁵¹. La dieta, y especialmente su contenido en grasa, se han asociado con los factores implicados en el desarrollo de SMet. Estudios epidemiológicos han documentado que dietas ricas en SFA se relacionan con un aumento del riesgo de desarrollar SMet³⁵². Por el contrario, una alta ingesta de fibra, antioxidantes, componentes fenólicos, PUFA n-3 de cadena larga y, particularmente, MUFA, se ha asociado de manera inversa al desarrollo de SMet³⁵³.

8.1. Dieta e inflamación

8.1.1 Efecto de la dieta sobre el estado inflamatorio en el Síndrome Metabólico

Un estilo de vida saludable, incluyendo la dieta y la actividad física, es importante para prevenir y tratar los componentes del SMet³⁵⁴. Se ha descrito que la cantidad y la naturaleza de los lípidos consumidos en la dieta son factores importantes en el proceso de la modulación de las respuestas inflamatorias e inmunes, particularmente, el grado de insaturación de los ácidos grasos de la dieta afecta a la composición de las lipoproteínas y a la expresión de factores relacionados con la inflamación. Existen numerosos estudios que evidencian que el consumo de dietas ricas en SFA inducen un proceso inflamatorio y contribuyen a desarrollar SMet, produciendo un aumento en la actividad del NFkB, y por tanto, un incremento en la expresión de IL-6, TNF- α y otras citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria³⁵⁰. Así, la sustitución de SFA por MUFA mantenía los niveles de HDL y disminuía los niveles de LDL³⁵⁵. De esta manera, estudios en animales evidencian que aceites de pescado ricos en MUFA tenían propiedades hipolipemiantes y antiinflamatorias, mediante la regulación negativa de varios genes inflamatorios y la regulación positiva del receptor gamma activado de peroxisoma (PPAR γ) y sus genes diana³⁵⁶. Los PPAR γ son factores de transcripción activados por lípidos y la evidencia acumulada ha sugerido que la activación de las vías de señalización PPAR γ suprime la progresión de la arteriosclerosis al regular el metabolismo lipídico, disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias³⁵⁷. En otro estudio publicado, *Esposito y cols* evaluaron el efecto de una dieta rica en MUFA sobre la función endotelial y diferentes

marcadores vasculares inflamatorios en pacientes con SMet³⁵⁸. Los resultados mostraron que el consumo de esta dieta se asociaba con una mejoría en la función endotelial así como una reducción de los marcadores de inflamación vascular sistémica³⁵⁹.

Por otro lado, evidencias crecientes en estudios tanto en humanos como animales indican que los PUFA n-3 inhiben la inflamación al alterar la transcripción de genes inflamatorios clave y compiten con el ácido araquidónico para las enzimas que participan en la biosíntesis de los eicosanoides proinflamatorios³⁶⁰. Además, resultados de recientes estudios han demostrado que los PUFA n-3 inhiben la activación del inflamasoma de NLRP3³⁶¹.

Recientemente, el estudio europeo de intervención dietética LIPGENE, mostró que pacientes con SMet que fueron aleatorizados para consumir cuatro tipos de dietas con diferente composición grasa, durante 12 semanas, exhibían una respuesta inflamatoria postprandial en tejido adiposo exacerbada, independiente de la calidad y la cantidad de la grasa consumida³⁶². Se evaluaron los cambios en el proteoma mostrando que el consumo de una dieta rica en SFA producía una mayor expresión de proteínas relacionadas con la inflamación y el EOX en comparación con las dietas del estudio³⁶³.

8.1.2 Efecto de la dieta sobre el estado inflamatorio en el envejecimiento

El envejecimiento supone uno de los desafíos sociales más importantes que enfrentan las sociedades occidentales, como resultado de una mayor esperanza de vida y unas tasas de natalidad reducidas. Implica un éxito de nuestros sistemas de salud y sociales, pero plantea problemas de sostenibilidad que están relacionados con la mayor necesidad de servicios de adultos mayores, debido a la reducción de su independencia y a la coexistencia de múltiples enfermedades crónicas³⁶⁴. El SMet puede considerarse una enfermedad relacionada con el envejecimiento, puesto que su prevalencia incrementa con la edad³⁶⁵.

La restricción calórica ha perdurado por más de 75 años como el método de intervención dietética más sólido para aumentar la longevidad y retrasar el envejecimiento, así como la aparición de patologías relacionadas con la edad³⁶⁶. Además, se ha descrito una estrecha relación entre el envejecimiento y un estado de inflamación leve, asociado a cambios en la producción y utilización de energía, homeostasis metabólica, senescencia inmune y salud neuronal³⁶⁷. La investigación epidemiológica nutricional sobre la modificación de los factores de riesgo y los estudios de intervención dietética en el envejecimiento han demostrado beneficios sobre ciertos factores de riesgo relacionados con la inflamación³⁶⁸. En un estudio de adultos de 45-84 años, *Nettleton y cols* encontraron una asociación positiva entre un patrón dietético rico en SFA y los niveles plasmáticos de PCR e IL-6, y una asociación inversa entre un patrón dietético rico en MUFA y PUFA y los niveles plasmáticos de PCR e IL-6³⁶⁹. Un estudio de intervención dietética realizado por nuestro grupo de investigación, donde 20 personas

mayores de 65 años fueron asignados para consumir cuatro dietas durante 4 semanas cada una (dieta Mediterránea, rica en MUFA, dieta Mediterránea suplementada en CoQ₁₀, dieta rica en SFA y dieta rica en PUFA n-3) mostró que aquellos sujetos que consumieron una dieta Mediterránea (con o sin suplementar en CoQ₁₀), presentaban una disminución en la respuesta inflamatoria postprandial en células mononucleares de sangre periférica en comparación con las demás dietas³⁷⁰. En este mismo estudio, Yubero-Serrano y cols observaron que la suplementación con CoQ₁₀ a la dieta Mediterránea disminuía la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y el estrés del retículo endoplásmico en estos pacientes³⁷¹, además de aumentar la actividad de enzimas antioxidantes y reducir los niveles de marcadores plasmáticos prooxidantes²²⁶.

8.2. Dieta y estrés oxidativo

La nutrición desempeña un papel fundamental en la aparición de EOX. Así mismo, es capaz de aumentar una cascada de reacciones moleculares en las células y alterar el estado metabólico de los tejidos³⁷². Se sugiere que el metabolismo oxidativo y la homeostasis redox son una parte esencial de la vida aeróbica. Los organismos vivos no pueden sobrevivir sin estos procesos. En condiciones desfavorables, los derivados del oxígeno pueden ocasionar deterioro a nivel de los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas; alterar el equilibrio oxidativo y la viabilidad celular. El EOX induce la formación en exceso de antioxidantes para proteger al organismo de su deficiencia³⁷³. Por otra parte, la nutrición puede inducir EOX, incluso en condiciones fisiológicas normales en el cuerpo humano, y los factores dietéticos también pueden servir como factores inflamatorios y pro-oxidantes³⁷⁴. Por tanto, el EOX nutricional podría describirse como un desequilibrio postprandial entre la defensa antioxidante y la carga pro-oxidante como consecuencia del suministro inadecuado o excesivo de nutrientes³⁷⁵.

8.2.1 Efecto de la dieta sobre el estrés oxidativo en el Síndrome metabólico

Se ha descrito que el consumo de dietas con alto contenido antioxidante, como la Dieta Mediterránea, caracterizada por un alto consumo de aceite de oliva, frutas y verduras, cereales, nueces ejercen un efecto beneficioso sobre el EOX e inflamación³⁷⁶. Diferentes estudios sugieren que pacientes con SMet y obesidad retrasaron y atenuaron las complicaciones asociadas, como la resistencia a la insulina, la HTA y la hiperlipemia, tras el consumo de este tipo de dieta, con una reducción del EOX y la inflamación³⁷⁷. *Mitjavila* y cols observaron que pacientes con SMet que consumieron una dieta Mediterránea durante un año, en comparación con aquellos que consumieron una dieta baja en grasa, mejoraba diferentes marcadores de EOX y disminuía el daño al ADN³⁷⁸. En un estudio publicado recientemente, *Sureda* y cols evaluaron las capacidades antioxidantes plasmáticas y la actividad de la xantina oxidasa (XOX) en pacientes con SMet, después de un periodo de 5 años de intervención con Dieta Mediterránea rica en aceite de oliva virgen extra o suplementada con nueces y una dieta baja en grasas,

mostrando que tras el consumo de la dieta Mediterránea (rica en aceite de oliva o suplementada con nueces) disminuía la actividad de XOx y aumentaba las capacidades antioxidantes plasmáticas en dichos pacientes³⁷⁹.

Peña-Orihuela y cols investigaron si la calidad y la cantidad de la grasa en la dieta modificaban la respuesta del sistema antioxidante en el tejido adiposo de pacientes con SMet, en el marco del estudio LIPGENE³⁸⁰. Los resultados demostraron que el consumo de una dieta rica en MUFA reducía el EOx en comparación con la dieta SFA al inducir una mayor respuesta antioxidante postprandial en el tejido adiposo en pacientes con SMet³⁸¹.

8.2.2. Efecto de la dieta sobre el estrés oxidativo en el envejecimiento

Los estudios en modelos experimentales han demostrado la importancia de la dieta en los estudios sobre el envejecimiento, puesto se ha descrito que el EOx se modula directamente por el tipo de grasa de la dieta³⁸². De hecho, estos estudios han demostrado la existencia de la relación entre la ingesta dietética de grasas, el envejecimiento y el EOx³⁸³. Además, se ha demostrado en modelos animales que el consumo de antioxidantes como suplementos dietéticos incrementa la longevidad³⁸⁴. En relación a estudios clínicos de intervención en humanos, *Meza-Miranda y cols* investigaron si el tipo de grasa de la dieta modificaba el EOx postprandial en el tejido adiposo en personas ancianas³⁸⁵. Para ello 20 participantes recibieron tres dietas durante 4 semanas cada una: una dieta rica en SFA, otra dieta Mediterránea (rica en MUFA) con aceite de oliva virgen y una dieta baja en grasas rica en carbohidratos complejos suplementada con α -linolenico de origen vegetal (CHO-PUFA). La dieta Mediterránea produjo un aumento de los niveles plasmáticos de glutatión reducido (GSH) postprandial y la relación GSH/glutatión oxidado en comparación con las demás dietas. Además, esta dieta disminuyó marcadores plasmáticos de EOx (lipoperóxidos y H₂O₂) en comparación con la dieta rica en SFA³⁸⁶.

8.3. Dieta y endotoxemia

El proceso de absorción intestinal de LPS es un proceso susceptible de ser modulado por dieta. Los primeros trabajos sugerían que comidas ricas en grasa favorecían la absorción postprandial de LPS en comparación con comidas bajas en grasa³⁸⁷. Posteriormente, varios trabajos han enfocado el papel del tipo de grasa en la dieta en la endotoxemia postprandial, como el de *Lyte y col* que comparó la ingesta de 3 comidas grasas (rica en PUFA n-3, en PUFA n-6 o en SFA) con una comida baja en grasa. Este estudio mostró que una comida grasa rica en PUFA n-3 reduce la endotoxemia en comparación con una comida rica en grasa saturada³⁸⁸. Otro estudio ha mostrado que contenido en compuestos fenólicos del aceite de oliva tiene un papel protector frente a la absorción postprandial de LPS³⁸⁹. No obstante, estos estudios muestran el efecto agudo de la cantidad y tipo de grasa en la comida, pero hasta la fecha ningún estudio en humanos ha evaluado el efecto del consumo a largo plazo de dietas con diferentes cantidad y

tipo de grasa en la endotoxemia postprandial. En modelos animales, sin embargo, se ha descrito que el consumo de PUFA n-6 aumenta la endotoxemia, mientras que el consumo de n-3 reduce los niveles de endotoxemia mediante un mecanismo asociado con cambios en la microbiota intestinal³⁹⁰.

8.4. Dieta y AGEs

Evidencias indican un papel importante de los AGEs durante el proceso del envejecimiento y en diferentes trastornos metabólicos. Los niveles de AGEs aumentan en un organismo con la edad, pero también está estrechamente relacionada con enfermedades neurodegenerativas, la insuficiencia renal y la DMT2, entre otras ³⁹¹.

En un estudio de reciente publicación, *Angoorani y cols* evaluaron la asociación entre los AGEs dietéticos y el riesgo de SMet y sus componentes, en una muestra representativa de 5848 pacientes de entre 19 y 70 años²⁷². Para ello se determinó el consumo diario de CML empleando un cuestionario de frecuencia de alimentos semicuantitativo validado³⁹². Los resultados sugieren que el consumo de AGEs dietéticos puede incrementar el riesgo de desarrollar SMet así como sus componentes asociados³⁹³. En otro estudio publicado, *Beeri y cols* comprobaron el efecto de los AGEs dietéticos en la aparición de deterioro cognitivo en personas de edad avanzada midiendo para ello los niveles séricos de MG. Los resultados mostraron una asociación positiva entre el consumo de una dieta rica en AGEs y el desarrollo de deterioro cognitivo en pacientes de edad avanzada ³⁹⁴. En otro de los estudios publicados al respecto, *Uribarri y cols* investigaron si el consumo excesivo de ciertos AGEs procedentes de la dieta estaba relacionado con la respuesta inflamatoria en adultos sanos, especialmente en personas de edad avanzada²⁴⁶. De esta manera, en una muestra de 172 voluntarios, clínicamente sanos, 70 hombres y 102 mujeres, se determinaron los niveles séricos de CML y MG así como marcadores de inflamación como la PCR y si estaban correlacionados con la ingesta dietética de AGEs²³⁹. Los resultados de este estudio demostraron que el mayor consumo de AGEs de la dieta se relacionaba con una mayor respuesta inflamatoria postprandial en personas de edad avanzada³⁹⁵.

8.4.1. Efecto de la dieta sobre los AGEs en el Síndrome Metabólico

Como ya se ha citado previamente, los AGEs derivados de los alimentos han surgido como contribuyentes a enfermedades crónicas debido a su abundancia en nutrientes alterados térmicamente²⁵². El papel de los AGEs derivados de la dieta en su toxicidad sistémica se confirmó en estudios que utilizaron una dieta baja en AGEs, en este caso suplementada con MG. Los roedores MG + viejos, pero no los ratones MG -, desarrollaron SMet en relación con la edad así como fibrosis renal y cardíaca, asociados con la inflamación y la depleción de SIRT1 en los tejidos sensibles a la insulina²⁴¹. También se ha descrito que la restricción de AGEs en la dieta mejoró la resistencia a la insulina e inflamación en humanos^{280,396}. En otro estudio

recientemente publicado, *Vlassara y cols* comprobaron el efecto de los AGEs sobre los componentes del SMet en pacientes obesos²⁷³. De este modo, pacientes obesos y con SMet fueron asignados para consumir dos dietas, una baja y otra rica en AGEs durante un período 12 meses. Los resultados mostraron que el consumo de una dieta baja en AGEs mejoraba la resistencia a la insulina en pacientes obesos con SMet y podría reducir el riesgo de desarrollo de DMT2.

8.4.2. Efecto de la dieta sobre los AGEs en el envejecimiento

Perrone y cols investigaron si el consumo de AGEs se asociaba con una mayor incidencia de enfermedad de Alzheimer en pacientes de edad avanzada. Para ello, se estimó la ingesta de AGEs dietéticos a través de varios estudios de cohortes del Proyecto de Envejecimiento Comunitario Washington Heights-Inwood (WHICAP) entre 1992 y 1999. Los resultados de dicho estudio, demostraron que una menor ingesta de AGEs se correlacionaba significativamente con una menor incidencia de enfermedad de Alzheimer en pacientes de edad avanzada³⁹⁷. Una reciente revisión sistemática para examinar la relación entre el consumo de AGEs a través de la dieta y los procesos inflamatorios en pacientes de edad avanzada. De esta manera se obtuvo que una disminución de la respuesta inflamatoria en sujetos con una dieta baja en AGEs, mientras que el incremento de los procesos relacionados con la inflamación debido a dietas ricas en AGEs fue menos aparente³⁹⁸. *Semba y cols* realizaron otra revisión sistemática sobre la relación de los AGEs y la dieta con el envejecimiento³⁹⁹. De este modo, se incluyó evidencia científica a partir de estudios *in vitro*, estudios de cohortes y ensayos clínicos tanto en humanos como animales. Los resultados sugirieron que la acumulación de los AGEs en los tejidos acelera el proceso del envejecimiento y que la restricción de la ingesta dietética de AGEs podría promover un envejecimiento más saludable³⁹⁵.

8.5. Dieta Mediterránea

El estilo de vida mediterráneo tradicional caracterizó durante siglos los hábitos y la cultura de la población que vive alrededor del mar Mediterráneo, y aplicó la frugalidad en el consumo de alimentos⁴⁰⁰. Este estilo de vida es considerado actualmente patrimonio cultural de la humanidad, teniendo otros aspectos además de la alimentación, tales como la convivencia, la estimulación sensorial, la socialización, la biodiversidad y la estacionalidad que pueden respaldar los efectos beneficiosos de la dieta Mediterránea sobre el bienestar, la calidad de vida y el envejecimiento saludable⁴⁰¹. En las últimas décadas ha crecido el interés por seguir un modelo de alimentación saludable. Según la *ATP III*, un modelo de alimentación saludable debe tener una ingesta de grasa del 25-35% de las calorías totales, con una proporción de <10% en SFA, <7% en PUFA y con un porcentaje máximo del 20% en MUFA⁴⁰². En este modelo, la ingesta de SFA y de colesterol es baja y la mayoría de las calorías provienen de comidas de origen vegetal. Dentro de los MUFA presentes en la dieta, el ácido oleico (cis C18:1 n-9) es el

más consumido y el 85% de la ingesta de esta grasa procede del aceite de oliva⁴⁰³. Este es el caso de la dieta Mediterránea, caracterizada por una alta ingesta de verduras, legumbres, frutas, frutos secos, cereales integrales, y especias, un elevado consumo de aceite de oliva (rico en MUFA), un moderado consumo de pescado y productos lácteos, una baja ingesta de carne, productos cárnicos procesados, cremas, mantequilla y margarina y un regular pero moderado consumo de vino. A pesar de ser una dieta con un alto contenido graso (en este caso MUFA), en comparación con otras dietas recomendadas durante décadas por nutricionistas, su consumo se ha relacionado con una mayor longevidad, mejor calidad de vida y menor incidencia de obesidad, ECV, cáncer o deterioro cognitivo⁴⁰⁴.

8.5.1 Dieta Mediterránea y Síndrome Metabólico

La Dieta Mediterránea es reconocida como uno de los patrones dietéticos más saludables, como ya hemos mencionado anteriormente. Sus efectos saludables se han demostrado en pacientes con ECV, y en la prevención y tratamiento de afecciones relacionadas tales como DMT2, HTA y SMet⁴⁰⁵. Varios estudios epidemiológicos y transversales y prospectivos han sugerido una asociación inversa entre la adherencia de una dieta Mediterránea y la prevalencia o incidencia de SMet⁴⁰⁶. La evidencia de los ensayos clínicos ha demostrado que la adopción de una dieta Mediterránea después de la pérdida de peso tiene un efecto beneficioso sobre el SMet⁴⁰⁷. Sin embargo, estos estudios no determinaron si el efecto podría atribuirse a la pérdida de peso producido durante el tiempo de intervención dietética, o al efecto de las dietas. Los datos del estudio PREDIMED (PREvención con Dieta MEDiterránea) sugirieron que la adherencia a una dieta Mediterránea suplementada con nueces revirtió el SMet en comparación con una dieta baja en grasas⁴⁰⁸. Con respecto a la dieta Mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra, los resultados del estudio mostraron también una tasa de reversión del SMet mayor en comparación con la dieta baja en grasas y este efecto beneficioso fue impulsado principalmente por la reducción de la circunferencia de cintura⁴⁰⁹. Los resultados de los primeros 772 participantes después de la intervención durante 3 meses mostraron una mejoría de la presión arterial, sensibilidad a la insulina, perfil lipídico y moléculas inflamatorias circulantes con las dos intervenciones de la dieta Mediterránea en comparación con la dieta baja en grasa⁴¹⁰.

8.5.2 Dieta Mediterránea y Envejecimiento

Un reciente estudio realizado sobre la dieta consumida, en población anciana en cuencas mediterráneas, mostró que el bajo contenido en proteína animal y el bajo índice glucémico que presentaba esta dieta podrían modular directamente las vías de insulina/IGF-1 y mTOR, que podrían ser una de las vías clave por las cuales la dieta Mediterránea ejerce sus efectos beneficiosos en el envejecimiento y la longevidad⁴¹¹. Específicamente, la reducción de la ingesta de proteína animal puede reducir significativamente las concentraciones séricas de IGF-

1 e inhibir la actividad de mTOR con una regulación negativa de la señal que conduce a la activación de FOXO3A y, por consiguiente, a la transcripción de genes homeostáticos que favorecen la longevidad⁴¹¹.

Estudios recientes han demostrado una asociación entre la longitud de los telómeros, la actividad de la telomerasa y la adherencia a la dieta Mediterránea en términos de sus efectos sobre el proceso de envejecimiento y la salud⁴¹². Dichos estudios han puesto de manifiesto que los pacientes con mayor adherencia a esta dieta tienen una mayor longitud de los telómeros, así como mayores niveles de actividad de la telomerasa en los glóbulos blancos periféricos⁴¹³. Por otro lado, *Assmann y cols* investigaron la asociación entre la adherencia a una dieta Mediterránea y envejecimiento saludable, en 3.012 participantes del estudio francés *SUPplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydant* (estudio SU.VI.MAX). Los resultados mostraron que la adherencia a este modelo de dieta se relacionaba con el retraso a desarrollar enfermedad crónica mayor (cáncer, ECV o DMT2) y un mejor funcionamiento físico y cognitivo⁴¹⁴.

II. HIPÓTESIS

III. HIPÓTESIS

El síndrome metabólico (SMet), considerado como el resultado de una compleja interacción entre factores genéticos, metabólicos y ambientales ⁴¹⁵, se considera una enfermedad postprandial, ya que los pacientes con SMet presentan un exagerado aumento de los niveles plasmáticos de triglicéridos, anormalidades en el metabolismo de lipoproteínas y un aumento de la respuesta inflamatoria. Se ha descrito que el envejecimiento es un factor adicional en la incidencia y desarrollo de dichas enfermedades metabólicas, como es el caso del SMet. Recientemente se ha demostrado que los pacientes con SMet presentan niveles elevados de productos de glicación avanzada (AGEs), glicotoxinas citotóxicas pro-oxidantes, las cuales muestran una alta asociación con marcadores de inflamación y de enfermedad metabólica ⁴¹⁶. La dieta, y en particular su contenido en grasa, pueden modular la respuesta inflamatoria postprandial. Se ha demostrado que el consumo de grasa monoinsaturada reduce la activación de la respuesta inflamatoria postprandial en comparación con grasas saturadas ³⁷⁰. Por otro lado, la dieta puede ser una fuente importante de AGEs, particularmente presentes en aquellos alimentos procesados a altas temperaturas, como es el caso de las dietas Occidentales ²⁶⁰.

En este proyecto de tesis doctoral, nuestra hipótesis de estudio es demostrar que la disminución de la respuesta inflamatoria postprandial observada tras el consumo de una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados, en comparación con una dieta rica en ácidos grasos saturados o una dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono complejos, podría ser causada por una menor acumulación endógena de productos finales de glicación avanzada y por una menor absorción intestinal de endotoxinas bacterianas (LPS), promoviendo una reducción del estado pro-inflamatorio y del estrés oxidativo. La hipótesis nula es que la ingesta de las diferentes dietas no modula la respuesta inflamatoria postprandial a través de la menor acumulación de los productos finales de glicación avanzada, y por una menor absorción intestinal de endotoxinas bacterianas.

III. OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Determinar el efecto del consumo a largo plazo de diferentes modelos de dieta con distinta cantidad y tipo de grasa, tanto en ayunas como en estado postprandial, en los niveles de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) así como en los niveles del lipopolisacárido (LPS) y de la proteína de unión a LPS (LBP), en personas con síndrome metabólico y en personas con edad avanzada (> 65 años) y su relación como mediadores del estrés oxidativo y de la respuesta inflamatoria. Para dar respuesta a este punto se plantean 3 objetivos principales (que corresponden con los cinco artículos derivados de esta Tesis):

Objetivo 1: Estudiar el efecto del consumo de diferentes modelos de dieta con distinta calidad y tipo de grasa tanto en ayunas como en estado postprandial, en los niveles de AGEs y el metabolismo de dichas glicotoxinas en pacientes con SMet (**Artículo 1**) y en una población de edad avanzada (**Artículo 2**).

Objetivo 2: Determinar si el aporte exógeno de CoQ (Coenzima Q₁₀, antioxidante endógeno) a una dieta Mediterránea (rica en MUFA) produce un efecto adicional en la reducción de los niveles de AGEs y en el metabolismo de estas glicotoxinas en una población sana de edad avanzada (**Artículo 3**).

Objetivo 3: Evaluar si el consumo de modelos de dieta con distinta calidad y cantidad de grasa determinan cambios en los niveles plasmáticos de LPS y LBP en pacientes con SMet. (**Artículo 4**) y en una población de edad avanzada (**Artículo 5**).

Objetivos secundarios

1. Analizar si la reducción de los niveles de AGEs se relaciona con una disminución en el aporte exógeno de estas glicotoxinas a través de cada uno de los modelos dietéticos en estudio.
2. Evaluar si la reducción de los niveles de AGEs se asocia con una disminución del EOX y a un aumento de las defensas antioxidantes tanto de pacientes con SMet como en aquellos de edad avanzada.

IV. PUBLICACIONES

**1. Dietary fat quantity and quality modifies
advanced glycation end products metabolism in
patients with metabolic syndrome**

RESEARCH ARTICLE

Dietary fat quantity and quality modifies advanced glycation end products metabolism in patients with metabolic syndrome

Javier Lopez-Moreno^{1,2}, Gracia M. Quintana-Navarro^{1,2}, Antonio Camargo^{1,2}, Rosa Jimenez-Lucena^{1,2}, Javier Delgado-Lista^{1,2}, Carmen Marin^{1,2}, Francisco J. Tinahones^{2,3}, Gary E. Striker⁴, Helen M. Roche⁵, Pablo Perez-Martinez^{1,2}, Jose Lopez-Miranda^{1,2*,**} and Elena M. Yubero-Serrano^{1,2**}

¹ Lipids and Atherosclerosis Unit, Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Spain

² CIBER Fisiopatologia Obesidad y Nutricion (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Spain

³ Biomedical Research Institute of Malaga (IBIMA), Virgen de la Victoria Hospital, University of Malaga, Malaga, Spain

⁴ Division of Experimental Diabetes and Aging, Department of Geriatrics, Divisions of Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA

⁵ Nutrigenomics Research Group, UCD Conway Institute/UCD Institute of Food and Health, School of Public Health, Physiotherapy and Sports Science, University College Dublin, Dublin, Ireland

Scope: Advanced glycation end products (AGEs) increase in dysmetabolic conditions. Lifestyle, including diet, has shown to be effective in preventing the development of metabolic syndrome (MetS). We investigated whether AGE metabolism is affected by diets with different fat quantity and quality in MetS patients.

Methods and results: A randomized, controlled trial assigned 75 MetS patients to one of four diets: high SFA (HSFA), high MUFA (HMFUFA), and two low-fat, high-complex carbohydrate diets (LFHCC) supplemented with long-chain n-3 PUFA or placebo for 12-weeks each. Dietary and serum AGE [methylglyoxal (MG: lysine-MG-H1) and N-carboxymethyllysine] levels and gene expression related to AGE metabolism in peripheral blood mononuclear cells (*AGER1*, *RAGE*, *Glox1*, and *Sirt1* mRNA) were determined. HMFUFA diet reduced serum AGE (sAGE) and *RAGE* mRNA, increased *AGER1* and *Glox1* mRNA levels compared to the other diets. LFHCC n-3 diet reduced sAGE levels and increased *AGER1* mRNA levels compared to LFHCC and HSFA diets. Multiple regression analyses showed that sMG and *AGER1* mRNA appeared as significant predictors of oxidative stress/inflammation-related parameters.

Conclusions: Low AGE content in HMFUFA diet reduces sAGEs and modulates the gene expression related to AGE metabolism in MetS patients, which may be used as a therapeutic approach to reduce the incidence of MetS and related chronic diseases.

Keywords:

Advanced glycation end products / Dietary fat / Inflammation / Metabolic syndrome / Oxidative stress



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Correspondence: Elena M. Yubero-Serrano

E-mail: helese35@hotmail.com

Abbreviations: AGE, advanced glycation end product; *AGER1*, AGE receptor-1; CML, N-carboxymethyllysine; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; *Glox1*, glyoxalase I; GSR, glutathione-S-reductase; LFHCC, low-fat and high-carbohydrate; LPO, lipid peroxidation product; MetS,

metabolic syndrome; MG, methylglyoxal; PC, protein carbonyls; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; ROS, reactive oxygen species; RAGE, receptor for AGE; SFA, saturated fatty acid; Sirt1, NAD-dependent deacetylase sirtuin-1; SOD, superoxide dismutase; TG, triglycerides

* Additional corresponding author: Jose Lopez-Miranda
E-mail: jlopezmir@uco.es

**These authors equally contributed to this work.

1 Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is a high-prevalent metabolic disorder characterized by hypertension, central (abdominal) obesity, hypertriglyceridemia, low HDL-cholesterol, and/or increased fasting glucose [1]. The incidence of MetS is rising worldwide and reaching epidemic proportions, mainly due to complex interactions between genetic and environmental factors. Consequently, MetS is considered a major cause of cardiovascular and kidney disease, diabetes, and other chronic diseases in industrialized societies [2]. Thus, prevention or early intervention to reverse MetS would reduce the incidence of these common diseases.

Lifestyle interventions, including diet and physical activity, may be more effective in the prevention of MetS development than pharmacological agents [3–5]. In this sense, intervention studies have consistently shown inverse associations between whole grains, fruit, and vegetable intake, as well as Mediterranean type diets (rich in MUFA) with MetS risk [6, 7]. Conversely high-fat diets rich in saturated fatty acids (SFA) promote obesity, inflammation, and insulin resistance with increased serum triglycerides (TG) and lower HDL-concentrations, that contribute to the development of this disease [8–11]. These findings are corroborated by several epidemiologic studies and clinical trials that support a beneficial effect from the Mediterranean diet on the reduction of the risk of type 2 diabetes (T2D) and MetS [12–14]. In this sense, the study of the mechanisms underlying the reported associations would lead to implement effective strategies to improve the prevention of these diseases.

Recent studies show the contribution of advanced glycation end products (AGEs) in the origin and progression of certain chronic diseases, as well as MetS [15, 16]. AGEs are a group of prooxidant and cytotoxic compounds, derived from the nonenzymatic glycation of proteins, lipids, and nuclear acids *via* a complex sequence of reactions referred as the Maillard reaction [17]. Small amounts of AGEs are generated *in vivo* as a normal consequence of metabolism, but when antioxidant mechanisms are damaged and/or inflammatory pathways are upregulated, as in the context of chronic diseases, tissue AGE concentration increases, producing deleterious effects [18]. However, it is described that endogenous AGE formation represents a minor component of the total body load of AGEs, being dietary AGEs (dAGEs) one of the most important source of AGEs [19].

dAGE content depends on the nutrient composition and on the way food is processed [20, 21]. New evidences suggest that AGE-restricted diets may be an effective method to reduce the body's total AGE concentration and decrease oxidative stress and inflammation [22, 23]. In this sense, T2D patients showed an improvement in insulin resistance and a reduction in serum AGE (sAGE) levels and markers related to inflammation and oxidative stress after consumption of AGE-restricted diets [23]. On the other hand, it is suggested that a Western style diet, rich in SFA, is a plentiful source of

exogenous dAGEs [24]. Nevertheless, to date, there is still a paucity of data with respect to the influence of the type of dietary fat in the modulation of endogenous AGE levels, especially regarding to MetS. We have previously demonstrated that consumption of a MUFA-rich diet reduces oxidative stress and inflammation in MetS patients [7, 25], compared to a SFA-rich diet or low-fat, high-carbohydrate (LFHCC) diets, supplemented or not with long-chain (LC) n-3 PUFA.

Taking all of this into account, we hypothesized that diet, specifically the quantity and quality of dietary fat, could also modulate sAGE levels and gene expression related to AGEs metabolism, with the subsequent reduction of oxidative stress and inflammation in patients with MetS, as a therapeutic approach to reduce the incidence of MetS and related chronic diseases.

2 Methods

2.1 Study population

This study was carried out in the Lipids and Atherosclerosis Unit at the Reina Sofia University Hospital, from February 2005 to April 2006 within the framework of the LIPGENE study (diet, genomics, and metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social, and economic analysis), a Framework 6 Integrated Project funded by the European Union. A subgroup of 75 patients with MetS, from the Spanish cohort of the multicentre LIPGENE study (Clinical Trial Registration Number: NCT00429195), were included in the current study. All participants gave written informed consent and underwent a comprehensive medical history, physical examination, and clinical chemistry analysis before enrolment. The experimental protocol was approved by the local ethic committee according to the Helsinki Declaration.

2.2 Study design

MetS was defined according to published criteria [26], which conformed to the LIPGENE inclusion and exclusion criteria [6]. MetS patients were randomly stratified to follow one of four dietary interventions (isoenergetic diets) for 12 weeks (long-term study) [25]. A postprandial study was analyzed where a fat challenge (test meal) was administered providing the same amount of fat (0.7 g/kg body weight), wherein the fatty acid composition reflected that consumed within the intervention period. The intervention study design and intervention protocol, which also provides information about food consumption and dietary compliance have previously described [27]. Briefly, dietary intake and compliance were assessed by a 3-day (2 weekdays and 1 weekend day) weighed food intake assessments at baseline, week 6, and week 12. Dietary analysis program reflective of the food choices were used (DietSource version 2.0).

2.3 Randomization and intervention

Randomization and intervention have been previously described in detail (Supporting Information Fig. 1) [7, 25]. Briefly, randomization was completed according to age, gender, and fasting plasma glucose concentration. Two diets were designed to provide 38% energy from fat: a high-fat, saturated fatty acid-rich diet (HSFA), which was designed to provide 16% energy as SFA, and a high-monounsaturated fatty acid-rich diet (HMUFA) designed to provide 20% energy from MUFA. The other two diets were low-fat, high-complex carbohydrate-rich diets [LFHCC and LFHCC (n-3); 28 % energy from fat]; the LFHCC (n-3) diet included a 1.24-g/day supplement of long-chain (n-3) PUFA [ratio of 1.4 eicosapentaenoic acid (EPA):1 docosahexaenoic acid (DHA)] and the LFHCC diet included a 1.2-g/day supplement of control high-oleic sunflower seed oil capsules (placebo). The composition of the diets and dietary targets has been previously described [7], and are also showed in Supporting Information Table 1.

Fat challenge, which represents a fat overload providing the same amount of fat (65%), allowed us to study the postprandial response after long-term adaptation to the corresponding diet, was administered to the patients at postintervention (at week 12) in the clinical intervention center at 8:00 a.m. following a 12-h fasting and refrained from smoking during the fasting period and abstained from alcohol intake during the preceding 7 days. Composition of diets and dietary targets, as well as the composition of the test meals has been previously described [7, 25]. Test meals provided an equal amount of fat (0.7 g/kg body weight), energy content (40.2 kJ/kg body weight), cholesterol (5 mg/kg of body weight), fiber, and vitamin A [62.9 μ mol vitamin A (retinol)/m² body surface area]. Briefly, HSFA, 38% energy from SFA, based on butter, whole milk, white bread, and eggs; HMUFA, 43% energy from MUFA, based on olive oil, skimmed milk, white bread, eggs, egg yolks, and tomatoes; LFHCC with placebo capsules, 16% energy as PUFA; LFHCC (n-3), 16% energy as PUFA [1.24 g/day of LC (n-3) PUFA (ratio 1.4 EPA:1 DHA)]. Meals after LFHCC diets were based on butter, olive oil, skimmed milk, white bread, eggs, egg yolks, and walnuts.

During the postprandial assessment, participants rested, and did not consume any other food, but were allowed to drink water.

2.4 Dietary AGEs intake

Assessment of dietary AGE (dAGEs) content was performed using 3-day weighed food diaries completed by the participants at baseline, after the long-term dietary intervention study (at 12 weeks) and at postprandial state (after 4 h of the test meal), emphasizing cooking methods. dAGE content was estimated from a database of approximately 560 foods that lists AGE values [21] and was expressed as AGE kilounits/g food.

2.5 Measurements

Serum and plasma samples were collected at baseline, after the long-term dietary intervention study and at postprandial state, and separated from whole blood by centrifugation at $1500 \times g$ for 20 min at 20°C and $1500 \times g$ for 15 min at 4°C, respectively within 1 h of extraction.

Lipid parameters determination was previously described [25]. Plasma glucose concentrations were measured using an Architect-GC16000 analyzer (Abbot Diagnostics) by the exoquinase method and plasma insulin concentrations were measured by chemoluminescence with and Architect-I2000SR analyser (Abbot Diagnostics).

Determination of the oxidative stress biomarkers in plasma [superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities, lipid peroxidation products (LPO), and protein carbonyls levels (PC), and reduced glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) ratio] were previously described [25, 28].

2.6 Determination of serum AGEs levels

Methylglyoxal (MG) [29] and N-carboxymethyllysine (CML) are the most well AGEs studied and serve as markers of AGE accumulation in several tissues [30]. Serum CML and MG (sCML and sMG) were determined by well-validated competitive ELISAs based on noncross-reactive monoclonal antibodies (mabs) for protein-bound CML (4G9 mab) and protein-bound MG derivatives [lysine-MG-H1 (3D11 mab)], characterized by HPLC, and used as immunogens [31, 32]. The resulting values reflect relatively stable protein- or peptide-associated CML and MG and not the free compounds. AGEs (interassay coefficients of variation, 2.8 and 5.2% for CML and MG, respectively; intraassay coefficients of variation, 2.6 and 4.1% for CML and MG, respectively) [22].

2.7 Isolation of RNA and quantification of the gene expression by real-time PCR

Blood was processed and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated as previously described [7]. PBMCs were isolated at baseline, after the long-term dietary intervention study, and at postprandial state. Total PBMC RNA was extracted using the Trizol method and quantified using a Nanodrop ND-1000 v3.5.2 spectrophotometer (Nanodrop Technology®, Cambridge, UK). RNA integrity was verified on agarose gel electrophoresis and stored at -80°C. Samples were digested with DNase I (AMPD-1 KT, Sigma) before real time-PCR. Real-time PCR reactions were carried out using the OpenArray™ NT Cyclor system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Each reaction was performed with a μ L of a 1:5 v/v dilution of the first cDNA synthesized from 1 μ g of total RNA using the commercial kit High Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. The gene expression analysis was performed on duplicated samples from 75 subjects at baseline, after the long-term dietary intervention study and at postprandial state (after 4h of the test meal). Primer pairs were selected from the database TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA; <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601267>), for the following genes: AGE receptor-1 (*AGER1*; *DDOST*, *Hs00193263_m1*), receptor for AGEs (*RAGE*; *AGER*, *Hs00153957_m1*), glyoxalase I (*Glo1*; *GLO*, *Hs00198702*), and NAD-dependent deacetylase sirtuin-1 (*Sirt1*; *SIRT1*, *Hs01009006_m1*). The relative expression for each analyzed gene was calculated with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*; *GAPDH*, *Hs99999905_m1*) as a housekeeping gene. The dataset were analyzed by OpenArray® Real-Time qPCR Analysis Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

2.8 Statistical analysis

PASW Statistics, Version a8, SPSS statistical software (Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. The Kolmogorov–Smirnov test did not show a significant departure from normality in the distribution of variance values. In order to evaluate data variation, an analysis of variance for repeated measures (ANOVA) was performed, where gender, smoking [nonsmokers, current smokers and ex-smokers (> 1 year)], alcohol intake [nondrinkers, occasional drinkers (< 8 g/day), drinkers (> 8 g/day)] and antioxidant intake were included as covariates. Bonferroni's test was used in all cases where post hoc analyses were required. We studied the statistical effects of the type of fat meal ingested (represented by p_1), the effect of time (represented by p_2), and the interaction of both factors (represented by p_3). Pearson's correlation analyses were performed to examine the correlations between sAGEs (sMG and sCML) levels, and AGE receptors (*AGER1* and *RAGE* mRNA levels) with different MetS-risk factors [gender, BMI, insulin, glucose, triglycerides, and HDL-cholesterol levels, diastolic and systolic blood pressure and homeostasis model assessment index (HOMA)], and other parameters related to inflammation and oxidative stress, previously published [7, 25, 33] [*Glo1*, *Sirt1*, NADPH oxidase subunits ($p22^{phox}$ and $p47^{phox}$), glutathione-S-reductase (*GSR*), NF- κ B (p65 subunit), and NF- κ B inhibitor (*I κ B α*) mRNA levels, plasma LPO and PC levels and SOD and GPx activities], after the long-term dietary intervention study and at postprandial state. Backward multiple linear regression analyses were performed to estimate the independent contribution of sAGE levels and AGEs receptors, smoking, and alcohol intake status, to those parameters related to inflammation and oxidative stress, after the long-term dietary intervention study and at postprandial state. Differences were considered to be significant when < 0.05 . All data presented in text and tables are expressed as means \pm SE.

3 Results

3.1 Baseline characteristics of the study population

There were no significant differences in age, BMI, and lipid-related risk factors, at baseline (preintervention), in the 75 MetS patients randomized to each dietary intervention, as we described previously (Supporting Information Table 2) [25].

3.2 dAGEs consumed in each dietary intervention

Fat composition in the dietary intervention study differed both in quality and quantity, and these were mirrored by differences in dAGE levels (Fig. 1A and Supporting Information Table 1). Participants assigned to HSFA diet consumed the highest and those assigned to HMUFA diet consumed the lowest amount of dAGEs, both after the long-term dietary intervention study as at postprandial state, compared to LFHCC and LFHCC n-3 (all $p < 0.05$). However, LFHCC diet provided lower dAGEs, after long-term intervention, compared to LFHCC n-3 diet although, in the postprandial study, both diets showed the same levels of these compounds (Fig. 1A).

3.3 Dietary fat composition altered sAGE levels

When we analyzed the effect of the diet, we observed that consumption of HSFA diet produced higher levels and, contrary the HMUFA diet lower levels, of sMG and sCML compared to the other diets (all $p < 0.05$) (Fig. 1B and C).

When we considered the effect of the time and the interaction of diet-time, sMG, and sCML levels increased after 12-weeks of consumption of HSFA and LFHCC n-3 diets, and decreased after HMUFA diet, compared to baseline levels (all $p < 0.05$). On the other hand, postprandial sMG and sCML levels decreased after HMUFA and LFHCC n-3 test meals compared to 12-weeks consumption ($p = 0.012$ and 0.022 , respectively) (Fig. 1B and C).

3.4 Dietary fat composition modulated expression of genes related to AGEs metabolism *AGER1* and *RAGE*

AGER1 and *RAGE* are the two main receptors that bind AGEs, to mediate opposite cellular responses. *AGER1* reduces AGE levels in the intracellular and extracellular spaces, resulting in its antioxidants properties [34]. By contrast, *RAGE* induces inflammation and promotes reactive oxygen species (ROS) [35].

When we analyzed the effect of the diet, we observed that consumption of HMUFA diet produced higher *AGER1* and lower *RAGE* mRNA levels, compared to the other diets (all $p < 0.05$) (Fig. 2A and B).

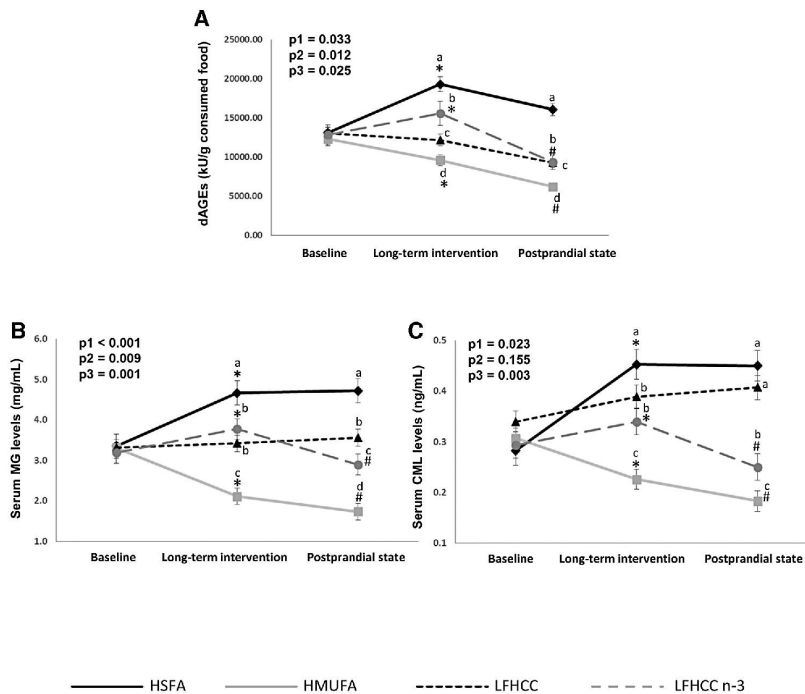


Figure 1. Dietary AGEs levels consumed at baseline, after long-term consumption (12 weeks) and at postprandial state (4 h after the test meal) (A) Serum levels of MG (B), and CML (C) at baseline, after long-term consumption (12 weeks) and at postprandial state (4 h after the test meal). Data were analyzed using ANOVA for repeated measures. All values represent the mean \pm SE. Bars with different superscript letters depict statistically significant differences ($p < 0.05$). p1: diet effect, p2: time effect, p3: diet \times time interaction. * $p < 0.05$ differences between baseline and long-term dietary intervention (12 weeks). # $p < 0.05$ differences between long-term dietary intervention and postprandial state (4 h after the test meal).

When we considered the effect of the time and the interaction of diet-time, *AGER1* mRNA levels increased and *RAGE* mRNA levels decreased after 12-weeks consumption of HMUFA and LFHCC n-3 diets (all $p < 0.05$), showing the opposite response after 12-weeks consumption of HSFA diet, compared to baseline levels ($p = 0.001$ and 0.004 , respectively) (Fig. 2A and B). On the other hand, postprandial *AGER1* mRNA levels increased after HMUFA and decreased after LFHCC n-3 test meal compared to 12-weeks consumption ($p = 0.007$ and 0.013 , respectively), and *RAGE* mRNA levels increased after HSFA test meal ($p = 0.013$) and decreased after LFHCC and HMUFA test meals compared to 12-weeks consumption ($p = 0.011$ and 0.009 , respectively) (Fig. 2A and B).

3.5 *Glox1* and *Sirt1*

When we analyzed the effect of the diet, we observed that consumption of HMUFA diet produced higher *Glox1* mRNA levels compared to HSFA diet ($p = 0.007$), with an intermediate effect after LFHCC and LFHCC n-3 diets ($p = 0.025$ and 0.019 , respectively). We also found that consumption of HMUFA and LFHCC n-3 diets produced higher *Sirt1* mRNA levels compared to the other diets (all $p < 0.05$) (Fig. 2C and D).

When we considered the effect of the time and the interaction of diet-time, *Glox1*, and *Sirt1* mRNA levels increased after 12-weeks consumption of HMUFA diet, and only *Glox1* mRNA decreased after HSFA diet, compared to baseline levels ($p = 0.033$, $p = 0.014$, and 0.005 , respectively). On the other hand, *Glox1* mRNA levels increased after HMUFA and LFHCC n-3 test meals ($p = 0.009$ and 0.009 , respectively), and *Sirt1* mRNA levels increased after HMUFA while that decreased after LFHCC test meal, compared to 12-weeks consumption (all $p < 0.05$) (Fig. 2C and D).

3.6 Relationship between AGEs and MetS-risk factors

The correlation analyses between sAGEs (sMG and sCML) levels, and AGE receptors (*AGER1* and *RAGE* mRNA levels) with different MetS-risk factors [gender, BMI, insulin, glucose, triglycerides and HDL-cholesterol levels, diastolic and systolic blood pressure and homeostasis model assessment index (HOMA)], after both long-term consumption (12-weeks) and at postprandial state (4 h after the test meal), showed that *RAGE* mRNA levels directly correlated with BMI ($r = 0.390$, $p = 0.011$; $r = 0.593$, $p < 0.001$, respectively) and HOMA ($r = 0.465$, $p = 0.002$; $r = 0.474$, $p = 0.0015$, respectively).

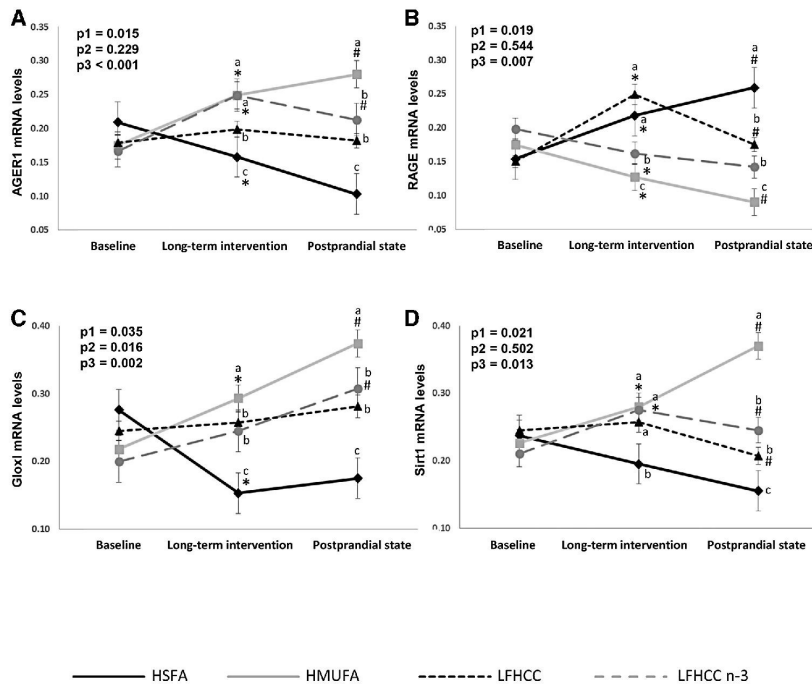


Figure 2. Levels of *AGER1* mRNA (A), *RAGE* mRNA (B), *Glox1* mRNA (C), and *Sirt1* mRNA (D) in peripheral mononuclear cells at baseline, after long-term consumption (12 weeks) and at postprandial state (4 h after the test meal). Data were analyzed using ANOVA for repeated measures. All values represent the mean \pm SE. Bars with different super-script letters depict statistically significant differences ($p < 0.05$). p_1 : diet effect, p_2 : time effect, p_3 : diet \times time interaction. * $p < 0.05$ differences between baseline and long-term dietary intervention (12 weeks). # $p < 0.05$ differences between long-term dietary intervention and postprandial state (4 h after the test meal).

3.7 Relationship between AGEs and their receptors and inflammatory/oxidative stress-related parameters

Figure 3 shows the correlation analyses between sAGE levels (sMG and sCML) and gene expression of the AGEs receptors (*AGER1* and *RAGE* mRNA levels) and gene expression of *Glox1*, all related to AGE metabolism, and Table 1 shows the correlation analyses between sAGE levels (sMG and sCML), gene expression of the AGEs receptors (*AGER1* and *RAGE* mRNA levels) and other parameters related to oxidative stress and inflammation, after both long-term consumption (12-weeks) and at postprandial state (4 h after the test meal). Oxidative stress and inflammation parameter levels, at the end of each dietary intervention period, have been previously published [7, 25] and are also provided as Supporting Information Table 3.

Our results showed that after a long-term dietary consumption, fasting sMG levels correlated positively with sCML levels and with parameters that determine oxidative damage (LPO and PC levels), and negatively with parameters related to antioxidant status/defense (*AGER1* and *Glox1* mRNA and GSH/GSSG ratio). Similarly, sCML levels positively correlated with sMG and PC levels, and negatively with GSH/GSSG ratio. On the other hand, *AGER1* mRNA positively correlated with *Glox1*, and *Sirt1* mRNA and GSH/GSSG ratio, and negatively with sMG and LPO levels and SOD activity. However, *RAGE* mRNA correlated positively with

NADPH oxidase subunits ($p22^{phox}$ and $p47^{phox}$ mRNA levels), *GSR* mRNA levels and GPx activity, and parameters related to inflammation (*p65* mRNA levels) (Table 1).

In the postprandial state, we found that sMG levels positively correlated with SOD activity, *RAGE* and *p65* mRNA, and negatively with *I κ B α* mRNA. sCML negatively correlated with *AGER1* mRNA and *AGER1* mRNA positively correlated with *I κ B α* mRNA and negatively with sCML levels, *RAGE* mRNA and GPx activity. In addition, *RAGE* positively correlated with sMG levels and negatively with *AGER1* mRNA (Table 1).

3.8 Independent association of AGEs levels and their receptors and parameters related to oxidative stress and inflammation

In order to determine the independent contribution of sAGE levels and AGEs receptors, smoking, and alcohol intake status in oxidative stress and inflammation, we performed different backward multiple linear regression analyses, after both long-term consumption (12 weeks) and at postprandial state (4 h after the test meal) (Table 2). Fasting *AGER1* mRNA levels appeared as a significant predictor of *Sirt1* mRNA levels, SOD activity, GSH/GSSG ratio, and *I κ B α* mRNA levels while *AGER1* mRNA and MG levels were significant contributors of *Glox1* mRNA levels and both *AGER1* and *RAGE* mRNA levels as significant contributors of *p65* mRNA levels. In

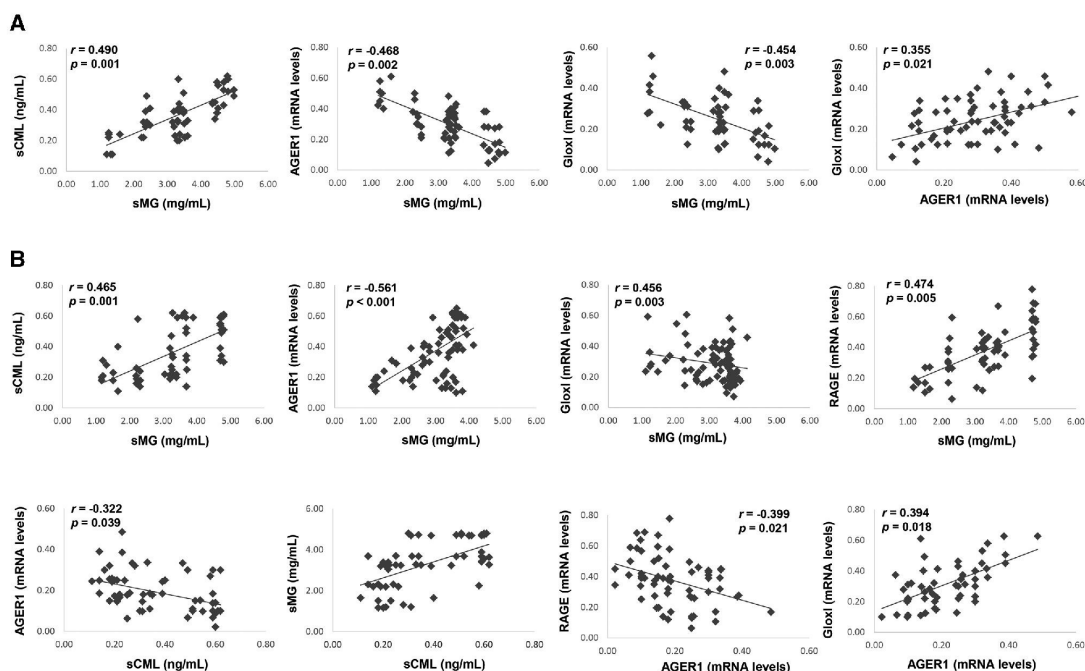


Figure 3. Correlations between sAGEs (sMG and sCML) levels and AGEs receptors (AGER1 and RAGE) in peripheral mononuclear cells, after the long-term dietary intervention study (A) and at postprandial state (B). $n = 75$. r (correlation coefficient) has been determined by Pearson's method; $p < .05$ is considered significant. AGEs (advanced glycation end products), sMG (serum methylglyoxal); sCML (serum N-carboxymethyllysine); Gloxl (glyoxalase I); AGER1 (advanced glycation end product receptor-1); RAGE (receptor for AGEs); Gloxl (glyoxalase I).

postprandial state, sMG levels appeared as a significant predictor of *Gloxl*, *Sirt1*, *p65*, and *IκBα* mRNA levels, SOD activity and GSH/GSSG ratio (Table 2).

4 Discussion

To the best of our knowledge, our study is the first to determine the potential effect of dietary fat composition on AGEs biology, inflammatory, and redox status and their association with MetS. In this sense, oxidant AGE levels are reduced and gene expression related to AGE metabolism is modulated after a long-term consumption and at postprandial state after a HMUFA diet.

MetS comprises a cluster of cardiovascular risk factors (low HDL-cholesterol, elevated blood pressure, fasting glucose and TG, and abdominal obesity) [36]. A large body of evidence supports the concept that increased oxidative stress and a state of chronic low-level inflammation may play an important role in MetS-related manifestations, including atherosclerosis, endothelial dysfunction, hypertension, and T2D [37, 38]. In fact, we recently demonstrated that the number of MetS components influence the degree of oxida-

tive stress in MetS patients providing a starting point for understanding the pathways that contribute to both the development of MetS and its subsequent complications [39].

On the other hand, high levels of circulating AGEs can lead to oxidative stress and chronic inflammation and are related to increased risk of diabetes and heart diseases in humans [40]. Moreover, there is a relationship between chronic exposure to diets with a higher content in dAGEs and chronic inflammation and insulin resistance [41]. In this sense, low-AGE diet consumption is related to a reduction in circulating AGEs levels and inflammation/oxidative stress in patients with age-related diseases [23, 42]. Serum AGE levels are directly related to dAGE consumed in the diet [43], which is in accordance with our results where consumption of a HMUFA diet provided lower dAGEs content compared to HSFA diet, with an intermediate effect of both LFHCC diets. Consequently, sAGE levels were mainly decreased after HMUFA diet. In contrast the HSFA diet, with the highest content in dAGE, increased sMG and sCML levels. Dietary intervention studies demonstrated that SFA-rich diets contain elevated quantities of AGEs with adverse consequences on health [42, 44]. On the other hand, the benefits of consumption of low fat diets (and rich in carbohydrates) on chronic diseases, as MetS, T2D, and

Table 1. Correlations between sAGEs (sMG and sCML) levels, AGEs receptors (AGER1 and RAGE) and other parameters related to oxidative stress and inflammation, after the long-term dietary intervention study and at postprandial state^{a)}

	Long-term dietary intervention (after 12 weeks)				Postprandial state (4 h after the test meal)			
	sMG	sCML	AGER1	RAGE	sMG	sCML	AGER1	RAGE
<i>Parameters related to oxidative stress</i>								
Sirt1 Mrna	n.s.	n.s.	0.403 0.008	n.s.	n.s.	n.s.	0.338 0.033	n.s.
p22 ^{phox} mRNA	n.s.	n.s.	n.s.	0.509 0.001	n.s.	n.s.	n.s.	0.499 0.002
p47 ^{phox} mRNA	n.s.	n.s.	n.s.	0.710 <0.001	n.s.	n.s.	n.s.	0.673 <0.001
GSR mRNA	n.s.	n.s.	n.s.	0.492 0.001	n.s.	n.s.	n.s.	0.592 <0.001
SOD activity (U/mL)	n.s.	n.s.	−0.411 0.011	n.s.	0.416 0.002	n.s.	−0.417 0.007	n.s.
GPx activity (mmol/mL/min)	n.s.	n.s.	n.s.	0.345 0.025	n.s.	n.s.	−0.357 0.024	0.415 0.003
GSH/GSSG ratio	−0.375 0.014	−0.384 0.019	0.437 0.004	n.s.	−0.436 0.004	−0.398 0.019	0.436 0.005	n.s.
LPO (μM)	0.307 0.041	n.s.	−0.311 0.044	n.s.	0.481 0.003	n.s.	−0.401 0.018	n.s.
PC (μmol/L)	0.441 0.004	0.429 0.004	n.s.	n.s.	0.471 0.004	0.344 0.036	n.s.	n.s.
<i>Parameters related to inflammation</i>								
p65 mRNA	n.s.	n.s.	n.s.	0.459 0.001	0.329 0.032	n.s.	n.s.	0.399 0.018
IκBα mRNA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	−0.310 0.044	n.s.	0.450 0.004	n.s.

a) *r* (correlation coefficient) has been determined by Pearson method; *p* values < 0.05 is considered significant.
n = 75; AGEs (advanced glycation end products); sMG (serum methylglyoxal); sCML (serum N-carboxymethyllysine); Sirt (NAD-dependent deacetylase sirtuin-1); p22^{phox} and p47^{phox} (subunits of NADPH oxidase); GSR (glutathione S reductase); SOD (superoxide dismutase); GPx (glutathione peroxidase); GSH (reduced glutathione); GSSG (oxidized glutathione); LPO (lipoperoxides); PC (protein carbonyls); p65 (subunit of NF-κB transcription factor); IκBα (inhibitor of NF-κB transcription factor, subunit α).

Table 2. Multiple linear regression analysis^{a)} testing the independent association between parameters related to oxidative stress and sAGEs levels and receptors after the long-term dietary intervention study and at postprandial state

Variables	Long-term dietary intervention (after 12 weeks)				Postprandial state (4 h after the test meal)				
	Unstandardized coefficients		Standardized coefficients	<i>p</i>	Unstandardized coefficients		Standardized coefficients	<i>p</i>	
	<i>B</i>	<i>SE</i>			<i>B</i>	<i>SE</i>			
GloxI mRNA (constant)	0.337	0.068		<0.001	GloxI mRNA (constant)	0.484	0.067	<0.001	
sMG	−0.046	0.016	−0.403	0.006	sMG	−0.058	0.019	−0.481	0.005
AGER1 mRNA	0.285	0.139	0.283	0.047					
Sirt1 mRNA (constant)	0.129	0.039		0.002	Sirt1 mRNA (constant)	0.462	0.048		<0.001
AGER1 mRNA	0.384	0.143	0.377	0.011	sMG	−0.063	0.014	−0.634	<0.001
SOD activity (constant)	9.511	1.593		<0.001	SOD activity (constant)	3.319	2.156		0.134
AGER1 mRNA	−13.562	6.544	−0.311	0.045	sMG	1.831	0.617	0.470	0.006
GSH/GSSG ratio (constant)	0.537	0.330		0.112	GSH/GSSG ratio (constant)	6.385	1.032		<0.001
AGER1 mRNA	4.164	1.356	0.437	0.004	sMG	−1.149	0.296	−0.572	<0.001
p65 mRNA (constant)	0.012	0.051		0.011	p65 mRNA (constant)	0.019	0.056		0.740
AGER1 mRNA	−0.038	0.014	0.366	0.005	sMG	0.031	0.016	0.329	0.041
RAGE mRNA	0.335	0.092	0.464	0.001					
IκBα mRNA (constant)	0.405	0.076		<0.001	IκBα mRNA (constant)	0.155	0.103		0.144
AGER1 mRNA	0.594	0.313	−0.288	0.035	sMG	−1.329	0.465	0.456	0.008

a) Predictive variables tested by backward method: sMG (mg/mL), sCML (ng/mL), AGER1 (mRNA levels), and RAGE (mRNA levels). *p* values < 0.05 is considered significant. *n* = 75. AGEs (advanced glycation end products), sMG (serum methylglyoxal); sCML (serum N-carboxymethyllysine); GloxI (glyoxalase I); Sirt1 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-1); SOD (superoxide dismutase); GSH (reduced glutathione); GSSG (oxidized glutathione); p65 (subunit of NF-κB transcription factor); IκBα (inhibitor of NF-κB transcription factor, subunit α).

cardiovascular disease are described [45]. Also PUFA have been associated with anti-inflammatory effects [46, 47]. Indeed, a recent study observed that dietary supplementation of n-3 PUFA appears to prevent renal dysfunction on diabetic rats after exposing them to high levels of AGE, via antioxidant and anti-inflammatory pathways [48]. Our data suggest that both low-fat diets (LFHCC and LFHCC n-3) provide a healthy effect on MetS patients compared to HSFA diet, but show an intermediate effect regarding to AGE content, compared to the HMUFA diet. Particularly, the higher dAGE levels provided by LHFCC n-3 diet could be explained due to the fact that highly unsaturated fats, such as PUFAs, are extremely vulnerable to be oxidized and more prone to form AGE, compared to MUFA-rich diets [49].

In response to high AGEs levels, the host defense system employs different mechanisms to restrict their toxicity and thus, reduces oxidative stress and inflammation. Glyoxalase system (mainly GloxI and II) [50] and AGER1/RAGE receptors are a part of the innate and adaptive defense to regulate the deleterious effects of AGEs [22, 51]. In this sense, GloxI catalyzes metabolism of dicarbonyls and prevents their binding with protein to form AGE. Also AGER1 suppresses AGE and AGE-related ROS and inflammation, wherein circulating RAGE propagates these effects by binding AGEs [52]. Serum levels of RAGE have been also associated with the MetS [53]. Our current results support this fact in relation to that sAGE

could serve as stimuli for observed changes in gene expression related to AGE metabolism. Namely, higher AGER1 and GloxI mRNA levels and lower RAGE mRNA levels observed after HMUFA diet intake, in both fasting and postprandial states, could also explain the reduction in sMG and sCML levels in MetS patients, compared to the other diets. These data suggest that the use of diets rich in MUFA would be a healthy and therapeutic strategy in the prevention of the MetS development, modulating AGEs metabolism and thus, reducing oxidative stress/inflammation.

On the other hand, the fact that postprandial sAGEs decreased despite AGER1 mRNA levels also decreased, during postprandial phase, after LFHCC n-3 diet could be explained due this is a highly integrated system, where circulating sAGEs formed after this diet could be eliminated by GloxI, particularly in the postprandial state.

Sirt1, a NAD⁺-dependent deacetylase, has a range of targets related to the metabolism at various tissues such as hepatic glucose homeostasis or pancreatic β cells insulin secretion [54], but also is well known its role as cell protector from oxidative stress injury. It has been described that suppressed Sirt1 mRNA levels found in diabetic patients increased to normal range when AGEs are restricted [23]. In the current study, the HMUFA diet contained less AGE, resulting in lower sAGE levels, with increased postprandial Sirt1 mRNA. This is supported by data that indicates that

postprandial oxidative stress variations may be found of the most essential period to reveal the healthy or detrimental effects of dietary interventions on oxidative status [28, 55].

Tissue accumulation of AGE may contribute to increased inflammation/oxidative stress, and may ultimately impair organ function, contributing to the development of MetS [32, 51]. In this way, we showed that fasting and postprandial RAGE mRNA levels were directly correlated with two important MetS risk factors: BMI (a marker of obesity) and HOMA (a marker of insulin resistance). Moreover, fasting and postprandial sCML, sMG, and RAGE mRNA levels were associated with genes/markers related to oxidative stress and inflammation and *AGER1* mRNA levels with genes/markers related to antioxidant defenses. In fact, multiple linear regression analyses showed that sMG and *AGER1* mRNA appeared as significant predictors of changes in the main parameters related to oxidative stress and inflammation.

Our study presents some limitations. First, ensuring adherence to dietary instructions is difficult in a feeding trial. However, adherence to recommended dietary patterns was good, as judged by rigorous dietary assessment measurements. Second, this study examines the redox state by measuring circulating concentrations but does not evaluate the effects on various tissues involved. However, the findings obtained could reflect what is occurring in different body tissues. On the other hand, our design has the strength of reproducing real-life conditions with home-prepared foods, reflecting usual practice.

In conclusion, our results provide the notion that consumption of a HMUFA diet has a protective effect against oxidative stress/inflammation, providing low AGE content and reducing circulating AGE concentrations, coincident with modulation of the genes related to AGEs metabolism in MetS patients. LFHCC n-3 diet had an intermediate effect relative to the other diets. These findings support recommendations to consume a HMUFA diet as a therapeutic approach to reduce the incidence of MetS and related chronic diseases.

The authors' responsibilities were as follows—J.L.-M. and H.M.-R. designed research and conducted research; J.D.-L., P.P.-M., and J.L.-M. provided materials or participants; J.L.-M., A.C., C.M., G.M.Q.-N., R.J.-L., and E.M.Y.-S. collected and assembled data; J.L.-M., and E.M.Y.-S. analyzed data; J.L.-M. and E.M.Y.-S. wrote the paper; G.E.S., F.J.T., and H.M.-R. provided significant advice and support in reviewing the drafting of the paper; J.L.-M. and E.M.Y.-S. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2012/39615, PIE14/00005, PIE14/00031 to J.L.M.); Consejería de Salud, Junta de Andalucía (PI0193/09 to J.L.-M.); Proyecto de Excelencia, Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo (CVI-7450 to J.L.-M.); Research Grant from the European Community (NUTRITECH European Integrated Project-289511) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Supported in part by research grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2004-07907, AGL2006-01979, AGL2009-12270 to J.L.-M.), Ministerio de Ciencia y Competitividad (AGL2012-39615, PIE14/00005, PIE14/00031 to J.L.-M., FIS PI10/01041 to P.P.-M., FIS PI13/00023 to J.D.-L.), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P06-CTS-01425 and PI-0193/09 to J.L.-M., PI-0252/09 to J.D.-L., and PI-0058/10 to P.P.-M.), Proyecto de Excelencia, Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo (CVI-7450 to J.L.-M.); Merck Serono and Fundación 2000 (Clinical research in Cardiometabolic to P.P.-M.), Research Grant from the European Community (NUTRITECH European Integrated Project-289511) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. HMR is supported by Science Foundation Ireland (SFI PI/11/1119). The authors acknowledge LIPGENE subjects and investigators, funded by European Commission FP6 (FOOD-CT-2003-505944).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Shaw, D. I., Hall, W. L., Williams, C. M., Metabolic syndrome: what is it and what are the implications? *Proc. Nutr. Soc.* 2005, **64**, 349–357.
- [2] Mokdad, A. H., Ford, E. S., Bowman, B. A., Dietz, W. H. et al., Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 2003, **289**, 76–79.
- [3] Orchard, T. J., Temprosa, M., Goldberg, R., Haffner, S. et al., The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 2005, **142**, 611–619.
- [4] Macias-Cervantes, M. H., Rodriguez-Soto, J. M., Uribarri, J., Diaz-Cisneros, F. J. et al., Effect of an advanced glycation end product-restricted diet and exercise on metabolic parameters in adult overweight men. *Nutrition* 2015, **31**(3), 446–451.
- [5] Amiot, M. J., Riva, C., Vinet, A., Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obes. Rev.* 2016, **17**, 573–586.
- [6] Perez-Martinez, P., Moreno-Conde, M., Cruz-Teno, C., Ruano, J. et al., Dietary fat differentially influences regulatory endothelial function during the postprandial state in patients with metabolic syndrome: from the LIPGENE study. *Atherosclerosis* 2010, **209**, 533–538.
- [7] Cruz-Teno, C., Perez-Martinez, P., Delgado-Lista, J., Yubero-Serrano, E. M. et al., Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012, **56**, 854–865.
- [8] Melanson, E. L., Astrup, A., Donahoo, W. T., The relationship between dietary fat and fatty acid intake and body weight, diabetes, and the metabolic syndrome. *Ann. Nutr. Metab.* 2009, **55**, 229–243.
- [9] Nettleton, J. A., Jebb, S., Riserus, U., Koletzko, B. et al., Role of dietary fats in the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Ann. Nutr. Metab.* 2014, **64**, 167–178.

- [10] Jimenez-Gomez, Y., Cruz-Teno, C., Rangel-Zuniga, O. A., Peinado, J. R. et al., Effect of dietary fat modification on subcutaneous white adipose tissue insulin sensitivity in patients with metabolic syndrome. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014, **58**, 2177–2188.
- [11] Harford, K. A., Reynolds, C. M., McGillicuddy, F. C., Roche, H. M., Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* 2011, **70**, 408–417.
- [12] Becerra-Tomas, N., Babio, N., Martinez-Gonzalez, M. A., Corella, D. et al., Replacing red meat and processed red meat for white meat, fish, legumes or eggs is associated with lower risk of incidence of metabolic syndrome. *Clin. Nutr.* 2016, **35**, 1442–1449.
- [13] Salas-Salvado, J., Guasch-Ferre, M., Lee, C. H., Estruch, R. et al., Protective effects of the mediterranean diet on type 2 diabetes and metabolic syndrome. *J. Nutr.* 2016, **146**, 920S–927S.
- [14] Diaz-Lopez, A., Babio, N., Martinez-Gonzalez, M. A., Corella, D. et al., Mediterranean diet, retinopathy, nephropathy, and microvascular diabetes complications: a post hoc analysis of a randomized trial. *Diabetes Care* 2015, **38**, 2134–2141.
- [15] Uribarri, J., Cai, W., Woodward, M., Tripp, E. et al., Elevated serum advanced glycation endproducts in obese indicate risk for the metabolic syndrome: a link between healthy and unhealthy obesity? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015, **100**, 1957–1966.
- [16] Ottum, M. S., Mistry, A. M., Advanced glycation end-products: modifiable environmental factors profoundly mediate insulin resistance. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2015, **57**, 1–12.
- [17] O'Brien, J., Morrissey, P. A., Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1989, **28**, 211–248.
- [18] Yubero-Serrano, E. M., Woodward, M., Poretzky, L., Vlassara, H. et al., Effects of sevelamer carbonate on advanced glycation end products and antioxidant/pro-oxidant status in patients with diabetic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2015, **10**, 759–766.
- [19] Uribarri, J., Cai, W., Sandu, O., Peppas, M. et al., Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann. NY Acad. Sci.* 2005, **1043**, 461–466.
- [20] Goldberg, T., Cai, W., Peppas, M., Dardaine, V. et al., Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.* 2004, **104**, 1287–1291.
- [21] Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W. et al., Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J. Am. Diet. Assoc.* 2010, **110**, 911–916, e12.
- [22] Vlassara, H., Cai, W., Goodman, S., Pyzik, R. et al., Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the anti-inflammatory AGE receptor-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009, **94**, 4483–4491.
- [23] Uribarri, J., Cai, W., Ramdas, M., Goodman, S. et al., Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care* 2011, **34**, 1610–1616.
- [24] Sebekova, K., Kraljcoviova-Kudlackova, M., Schinzel, R., Faist, V. et al., Plasma levels of advanced glycation end products in healthy, long-term vegetarians and subjects on a western mixed diet. *Eur. J. Nutr.* 2001, **40**, 275–281.
- [25] Perez-Martinez, P., Garcia-Quintana, J. M., Yubero-Serrano, E. M., Tasset-Cuevas, I. et al., Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clin. Sci.* 2010, **119**, 251–261.
- [26] Grundy, S. M., Brewer, Jr., H. B., Cleeman, J. I., Smith, Jr., S. C. et al., Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, **24**, e13–e18.
- [27] Shaw, D. I., Tierney, A. C., McCarthy, S., Upritchard, J. et al., LIPGENE food-exchange model for alteration of dietary fat quantity and quality in free-living participants from eight European countries. *Br. J. Nutr.* 2009, **101**, 750–759.
- [28] Yubero-Serrano, E. M., Delgado-Casado, N., Delgado-Lista, J., Perez-Martinez, P. et al., Postprandial antioxidant effect of the Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 in elderly men and women. *Age* 2011, **33**, 579–590.
- [29] Thornalley, P. J., Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* 1996, **27**, 565–573.
- [30] Arsov, S., Graaff, R., van Oeveren, W., Stegmayr, B. et al., Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014, **52**, 11–20.
- [31] Cai, W., Gao, Q. D., Zhu, L., Peppas, M. et al., Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol. Med.* 2002, **8**, 337–346.
- [32] Cai, W., Ramdas, M., Zhu, L., Chen, X. et al., Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012, **109**, 15888–15893.
- [33] Camargo, A., Pena-Orihuela, P., Rangel-Zuniga, O. A., Perez-Martinez, P. et al., Peripheral blood mononuclear cells as in vivo model for dietary intervention induced systemic oxidative stress. *Food Chem. Toxicol.* 2014, **72**, 178–186.
- [34] Cai, W., He, J. C., Zhu, L., Chen, X. et al., Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet: association with increased AGER1 expression. *Am. J. Pathol.* 2007, **170**, 1893–1902.
- [35] Rojas, A., Delgado-Lopez, F., Gonzalez, I., Perez-Castro, R. et al., The receptor for advanced glycation end-products: a complex signaling scenario for a promiscuous receptor. *Cell Signal.* 2013, **25**, 609–614.
- [36] Reaven, G., Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation* 2002, **106**, 286–288.
- [37] Ceriello, A., Motz, E., Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and

- cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24, 816–823.
- [38] Sanchez-Rodriguez, M. A., Martinez-Cruz, M., Correa-Munoz, E., Mendoza-Nunez, V. M., Relationship between metabolic syndrome components and oxidative stress in elderly community-dwelling Mexicans. *Ann. Nutr. Metab.* 2010, 56, 302–307.
- [39] Yubero-Serrano, E. M., Delgado-Lista, J., Pena-Orihuela, P., Perez-Martinez, P. et al., Oxidative stress is associated with the number of components of metabolic syndrome: LIP-GENE study. *Exp. Mol. Med.* 2013, 45, e28.
- [40] Prasad, A., Bekker, P., Tsimikas, S., Advanced glycation end products and diabetic cardiovascular disease. *Cardiol. Rev.* 2012, 20, 177–183.
- [41] Vlassara, H., Striker, G. E., AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011, 7, 526–539.
- [42] Cai, W., Uribarri, J., Zhu, L., Chen, X. et al., Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 4940–4945.
- [43] Delgado-Andrade, C., Tessier, F. J., Niquet-Leridon, C., Seiquer, I. et al., Study of the urinary and faecal excretion of Nepsilon-carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino Acids* 2012, 43, 595–602.
- [44] Uribarri, J., Cai, W., Pyzik, R., Goodman, S. et al., Suppression of native defense mechanisms, SIRT1 and PPARgamma, by dietary glycoxidants precedes disease in adult humans; relevance to lifestyle-engendered chronic diseases. *Amino Acids* 2014, 46, 301–309.
- [45] Shirani, F., Salehi-Abargouei, A., Azadbakht, L., Effects of dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet on some risk for developing type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis on controlled clinical trials. *Nutrition* 2013, 29, 939–947.
- [46] Calder, P. C., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T. et al., Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br. J. Nutr.* 2011, 106(Suppl 3), S5–S78.
- [47] Lozano, A., Perez-Martinez, P., Marin, C., Tinahones, F. J. et al., An acute intake of a walnut-enriched meal improves postprandial adiponectin response in healthy young adults. *Nutr. Res.* 2013, 33, 1012–1018.
- [48] de Assis, A. M., Rech, A., Longoni, A., da Silva Morrone, M. et al., Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids revert renal responses induced by a combination of 2 protocols that increase the amounts of advanced glycation end product in rats. *Nutr. Res.* 2015, 35, 512–522.
- [49] Fu, M. X., Requena, J. R., Jenkins, A. J., Lyons, T. J. et al., The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 9982–9986.
- [50] Vlassara, H., Cai, W., Crandall, J., Goldberg, T. et al., Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 15596–15601.
- [51] Vlassara, H., Striker, G., Glycotoxins in the diet promote diabetes and diabetic complications. *Curr. Diab. Rep.* 2007, 7, 235–241.
- [52] Coughlan, M. T., Thorburn, D. R., Penfold, S. A., Laskowski, A. et al., RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009, 20, 742–752.
- [53] Hudson, B. I., Dong, C., Gardener, H., Elkind, M. S. et al., Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end-products and metabolic syndrome: the Northern Manhattan Study. *Metabolism* 2014, 63, 1125–1130.
- [54] Purushotham, A., Schug, T. T., Xu, Q., Surapureddi, S. et al., Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab.* 2009, 9, 327–338.
- [55] Yubero-Serrano, E. M., Gonzalez-Guardia, L., Rangel-Zuniga, O., Delgado-Casado, N. et al., Postprandial antioxidant gene expression is modified by Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q(10) in elderly men and women. *Age* 2013, 35, 159–170.

2. Mediterranean diet reduces serum advanced glycation end products and increases antioxidant defenses in elderly adults: A randomized controlled trial

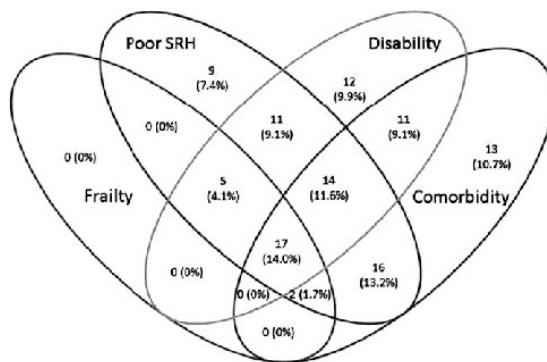


Figure 1. Overlap of frailty, disability, comorbidity, and poor self-rated health (SRH).

ity), and subjective (poor SRH) health outcomes. Every frail participant had at least one adverse outcome, although having one of these adverse conditions did not necessarily confer frailty, even in these extremely old adults. Furthermore, 90.9% of participants were nonfrail or prefrail or had one or a combination of comorbidity, disability, or poor SRH, indicating that there is much heterogeneity in frailty status among near-centenarians and centenarians. These findings underscore the importance of frailty screening for these exceptional survivors, because their frailty status may lead healthcare professionals to discover multiple underlying health and psychosocial problems.

Interventions such as resistance and aerobic exercises, caloric and protein support, dietary supplementation, and reduction of polypharmacy may slow or even reverse the progression of frailty.^{1,4} Programs based on the principles of traditional Chinese medicine, such as qigong and tai chi, have also attained preliminary success in improving disability, mobility, and handgrip strength and reducing falls.^{8,9} Multidimensional programs, knitting exercises, dietary supplementation, and psychosocial intervention together may ultimately help promote autonomy and participation in family and social roles, adding life to years.¹⁰

This is the first study to report the prevalence of overlap of frailty, comorbidity, disability, and poor SRH in community-dwelling near-centenarians and centenarians. The findings show that frailty status may indicate deficits in multiple dimensions of health in these very old adults. It was also found that a significant proportion of community-dwelling near-centenarians and centenarians were not frail, suggesting that frailty could be avoided, or even reversed, even in the tenth decade of life.

Bobo Hi-Po Lau, PhD
Faculty of Social Sciences, University of Hong Kong,
Hong Kong

Joseph Kwan, MD
Department of Medicine, University of Hong Kong,
Hong Kong

Karen Siu-Lan Cheung, PhD
Department of Social Work and Social Administration,
Sau Po Centre on Ageing, University of Hong Kong,
Hong Kong

ACKNOWLEDGMENTS

Portions of the results of this manuscript were presented at the 21st International Centenarian Consortium, Sardinia, Italy, June 18–20, 2015.

Conflict of Interest: All authors declare no conflict of interests.

This study was supported by the Seed Funding Program for Basic Research, the matching fund from the Department of Social Work and Social Administration at University of Hong Kong (Project No. 104001032), and AXA.

Author Contributions: Lau: data analysis, writing the manuscript. Kwan: expert advice, comments on manuscript. Cheung: principal investigator, comment on manuscript.

Sponsor's Role: The funding bodies had no role in the design, methods, subject recruitment, data collection, analysis, or preparation of the paper.

REFERENCES

1. Morley JE, Vellas B, van Kan GA et al. Frailty consensus: A call to action. *J Am Med Dir Assoc* 2013;14:392–397.
2. Duarte N, Teixeira L, Ribeiro O et al. Frailty phenotype criteria in centenarians: Findings from the Oporto Centenarian Study. *Eur Geriatr Med* 2014;5:371–376.
3. Kwan JSK, Lau BHP, Cheung KSL. Toward a comprehensive model of frailty: An emerging concept from the Hong Kong Centenarian Study. *J Am Med Dir Assoc* 2015;16:536.e1–536.e7.
4. Fairhall N, Aggar C, Kurlle SE et al. Frailty Intervention Trial (FIT). *BMC Geriatr* 2008;8:27–36.
5. Van Kan GA, Rolland Y, Bergman H et al. The IANA Task Force on frailty assessment of older people in clinical practice. *J Nutr Health Aging* 2008;12:29–37.
6. Jylhä M. What is self-rated health and why does it predict mortality? Towards a unified conceptual model. *Soc Sci Med* 2009;69:307–316.
7. Charlson ME, Pompei P, Ales KL et al. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis* 1987;40:373–383.
8. Wolf SL, Barnhart HX, Kutner NG et al. Reducing frailty and falls in older persons: An investigation of tai chi and computerized balance training. *J Am Geriatr Soc* 1996;44:489–497.
9. Tsang HW, Lee JL, Au DW et al. Developing and testing the effectiveness of a novel health qigong for frail elders in Hong Kong: A preliminary study. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:827392.
10. Havighurst RJ. Successful aging. *Gerontol* 1961;1:299–320.

MEDITERRANEAN DIET REDUCES SERUM ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS AND INCREASES ANTIOXIDANT DEFENSES IN ELDERLY ADULTS: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL

To the Editor: A growing body of evidence indicates that oxidative stress and chronic inflammation are primary risk factors underlying the aging process and age-related

diseases.^{1,2} Addressing these mechanisms could have implications for aging and lead to new therapeutic approaches to these conditions.

Advanced glycation end products (AGEs), compounds derived from glycation of proteins and lipids as result of the Maillard reaction, are generated in vivo as a normal consequence of metabolism. Recent studies reveal the contribution of AGEs, particularly methylglyoxal (MG) and N-carboxymethyllysine (CML), the principal forms of AGEs, in the origin and progression of chronic diseases and during the aging process, increasing oxidative stress and inflammation.³⁻⁵ Although endogenous AGE formation represents a minor component of the total body pool of AGEs, dietary AGEs (dAGEs) are considered the most important source of AGEs.⁶ New evidence suggests that an AGE-restricted diet is an effective way to reduce the body's total AGE concentration and decrease oxidative stress and inflammation in different populations.⁷ Nevertheless, there is still a paucity of data with respect to the influence of dietary fat type on modulation of endogenous AGE levels.

The purpose of the current study was to determine whether the quantity and quality of dietary fat could modify serum AGE (sCML and sMG) levels and the expression of genes related to oxidative stress, inflammation, and AGE metabolism in healthy elderly adults.

METHODS

Twenty participants (aged ≥ 65 ; 10 male, 10 female) were randomly assigned to receive, in a crossover design, three isocaloric diets for 4-week periods each: Mediterranean diet (38% of energy from fat: 24% monounsaturated fatty acids (MUFA; provided by virgin olive oil), 10% saturated fatty acids (SFA), 4% polyunsaturated fatty acids (PUFA)); Western diet rich in saturated fat (38% of energy as fat: 12% MUFA, 22% SFA, 4% PUFA); low-fat, high-carbohydrate diet enriched in omega-3 PUFA of vegetable origin (omega-3 diet) (28% of energy as fat: 10% SFA, 12% MUFA, 8% PUFA with 2% alpha-linolenic acid). At the end of the dietary intervention period, subjects were given a breakfast with the same fat composition as consumed in each of the diets after a 12-hour fast. Blood samples were collected at the end of each diet period (fasting state) and 4 hours after breakfast (postprandial state). The human investigation review committee of the Reina Sofia University Hospital approved the study protocol according to institutional and Good Clinical Practice guidelines.⁸

Dietary AGE content;⁹ CML and MG levels; and AGE receptor-1 (*AGER1*), receptor for AGEs (*RAGE*), and glyoxalase I (*Gloxi*) messenger ribonucleic acid levels (mRNA) in peripheral mononuclear cells were determined. PASW Statistics, version a8, SPSS statistical software (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for statistical analysis. Analysis of variance for repeated measures was performed, followed by Bonferroni correction for multiple comparisons. Pearson correlation analyses were performed to examine correlations between dAGE levels and other parameters related to oxidative stress and inflammation. Differences were considered to be significant at $P < .05$. All data presented are expressed as means and standard errors.

RESULTS

During the SFA diet, participants consumed more dAGEs than after the other diets, with the Mediterranean diet providing the lowest amount of food-related AGEs, and the omega-3 diet having an intermediate content (Figure 1A).

Fasting and postprandial sMG and sCML were higher after the SFA diet than after the Mediterranean diet, with an intermediate effect for the omega-3 diet ($P = .005$) (Figure 1B, C). Moreover, sMG levels decreased significantly more during the postprandial phase in Mediterranean diet group ($P = .03$) (Figure 1B).

Fasting and postprandial *AGER1* and *Gloxi* mRNA levels, with antioxidant properties, were higher after the Mediterranean diet than after the SFA diet (all $P < .005$). Furthermore, *AGER1* and *Gloxi* mRNA levels were significantly greater during the postprandial state than in the fasting state after the Mediterranean and omega-3 diets (all $P < .005$) (Figure 1D, E).

Fasting and postprandial *RAGE* mRNA levels, an AGE receptor that induces oxidative stress and inflammation, were lower after the Mediterranean diet than the other diets (all $P < .005$), with an intermediate effect for the omega-3 diet during the postprandial state ($P = .007$). *RAGE* mRNA levels were significantly lower during the postprandial state after the Mediterranean and omega-3 diets than during the fasting state ($P = .004$) (Figure 1F).

A positive correlation was found between sMG and sCML, with genes and markers related to oxidative stress and inflammation such as *RAGE*, matrix metalloproteinase 9, plasma 8-hydroxydeoxyguanosine, and oxidized low-density lipoprotein levels, and a negative correlation with genes and markers related to antioxidant defenses such as *Gloxi*, glutathione peroxidase, and thioredoxin (data not shown).

DISCUSSION

The present study showed that consumption of a Mediterranean diet reduces oxidant AGEs and increases antioxidant defenses in the fasting and postprandial states, as lower sCML and sMG levels, higher *AGER1* and *Gloxi*, and lower *RAGE* mRNA levels than with the SFA diet manifested, with an intermediate effect of the omega-3 diet. The Mediterranean diet may have protective effects against oxidative stress and inflammation, providing low AGE content and reducing circulating AGEs in elderly people, which may have favorable effects on the aging process and be linked to the benefits of consuming a Mediterranean diet on the prevalence of age-related conditions. Inhibition of AGE formation may limit oxidative and inflammatory damage in tissues, retarding the progression of pathophysiology and improving quality of life during aging.

Javier Lopez-Moreno, MD
 Gracia M. Quintana-Navarro, BS
 Javier Delgado-Lista, PhD, MD
 Antonio Garcia-Rios, PhD, MD
 Nieves Delgado-Casado, PhD, MD

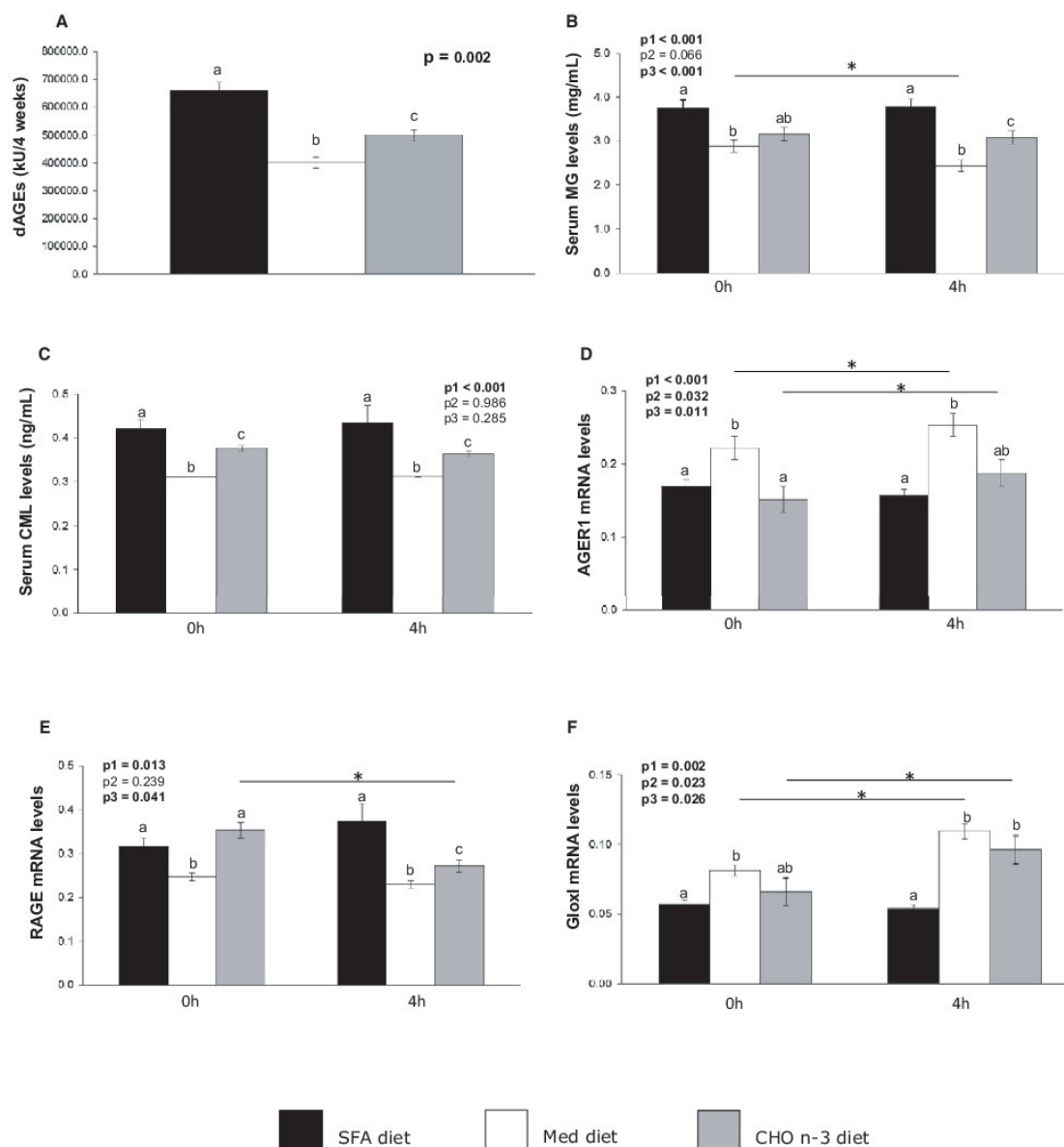


Figure 1. (A) Dietary advanced glycation end product (AGE) levels after 4 weeks of each dietary intervention, (B) fasting and postprandial serum levels of methylglyoxal (MG), (C) and N-carboxymethyllysine (CML), fasting and postprandial levels of (D) AGE receptor-1 (AGER1) messenger ribonucleic acid (mRNA), (E) receptor for AGE (RAGE) mRNA, and (F) glyoxalase I (Glo1) mRNA in peripheral mononuclear cells according to the different diets consumed. Data were analyzed using analysis of variance for repeated measures. All values represent means and standard errors. Bars with different superscript letters depict statistically significant differences ($P < .05$). p1 = diet effect; p2 = time effect; p3 = diet by time interaction.

Antonio Camargo, PhD
 Pablo Perez-Martinez, PhD, MD
 Lipids and Atherosclerosis Unit, Instituto Maimónides de
 Investigación Biomédica de Córdoba, Reina Sofia
 University Hospital, University of Córdoba, Córdoba,
 Spain
 CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición, Instituto de
 Salud Carlos III, Córdoba, Spain

Gary E. Striker, PhD, MD
 Division of Experimental Diabetes and Aging, Department
 of Geriatrics, Icahn School of Medicine at Mount Sinai,
 New York, New York

Francisco J. Tinahones, PhD, MD
 Biomedical Research Institute of Málaga, Virgen de la
 Victoria Hospital, University of Málaga, Málaga, Spain

Francisco Perez-Jimenez, PhD, MD
 Jose Lopez-Miranda, PhD, MD
 Elena M. Yubero-Serrano, PhD
 Lipids and Atherosclerosis Unit, Instituto Maimónides de
 Investigación Biomédica de Córdoba, Reina Sofia
 University Hospital, University of Córdoba, Córdoba,
 Spain
 CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición, Instituto de
 Salud Carlos III, Córdoba, Spain

ACKNOWLEDGMENTS

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to disclose.

Supported in part by research grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2004-07907, AGL2006-01979, AGL2009-12270), Ministerio de Ciencia y Competitividad (AGL2012-39615) to J L-M; FIS PI10/01041 to P P-M; FIS PI13/00023 to J D-L, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P06-CTS-01425 and PI0193/09 to J L-M, PI-0252/09 to J D-L, PI-0058/10 to P P-M), Proyecto de Excelencia, Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo (CVI-7450 to J L-M); Merck Serono and Fundación 2000 (Clinical research in Cardiometabolic to P P-M). The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Author Contributions: Lopez-Miranda, Perez-Jimenez: designed and conducted research. Delgado-Lista, Delgado-Casado, Garcia-Rios, Perez-Martinez, Lopez-Moreno: acquired data and participants. Lopez-Moreno, Camargo, Delgado-Casado, Quintana-Navarro, Yubero-Serrano: data collection. Lopez-Miranda, Yubero-Serrano: data analysis. Lopez-Moreno, Yubero-Serrano: writing the manuscript. Striker, Delgado-Lista, Tinahones, Perez-Martinez: significant advice and support in reviewing the drafting of the paper. Lopez-Miranda, Yubero-Serrano: primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Droge W. The plasma redox state and ageing. *Ageing Res Rev* 2002;1:257-278.
2. Chung HY, Sung B, Jung KJ et al. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:572-581.
3. Cai W, Uribarri J, Zhu L et al. Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:4940-4945.
4. Nin JW, Jorsal A, Ferreira I et al. Higher plasma levels of advanced glycation end products are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. *Diabetes Care* 2011;34:442-447.
5. Yubero-Serrano EM, Woodward M, Poretsky L et al.; AGE-less Study Group. Effects of sevelamer carbonate on advanced glycation end products and antioxidant/pro-oxidant status in patients with diabetic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10:759-766.
6. Vlassara H, Cai W, Crandall J et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15596-15601.
7. Vlassara H, Cai W, Goodman S et al. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4483-4491.
8. Yubero-Serrano EM, Delgado-Casado N, Delgado-Lista J et al. Postprandial antioxidant effect of the Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 in elderly men and women. *Age (Dordr)* 2011;33:579-590.
9. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* 2010;110:911-916 e12.

EQUIVOCAL ASSOCIATION BETWEEN BODY MASS INDEX AND DIABETES MELLITUS IN ELDERLY ADULTS

To the Editor: Diabetes mellitus is more prevalent in individuals with higher body mass index (BMI),¹ so initial screening for diabetes mellitus according to BMI has been recommended.² Aging also has a strong effect on diabetes mellitus,³ but no conclusive data have been obtained regarding effects of age on the relationship between body weight and diabetes mellitus. This was evaluated using data from two independent cohorts of Japanese individuals.

This was a retrospective analysis of data sets provided by the Health Center of Aizawa Hospital and Chikuma Central Hospital. The cohorts consisted of individuals undergoing an examination that included a 75-g oral glucose tolerance test (OGTT); individuals with a known history of diabetes mellitus were excluded. Characteristics of the Aizawa cohort, which was stratified according to age (<45, 45-54, 55-64, ≥65), are presented in Table 1. Characteristics of the Chikuma cohort (N = 502), which was divided into two groups (<65, ≥65), have been reported elsewhere.⁴ The hospital review boards of Aizawa Hospital and Chikuma Hospital approved the study protocol. Diabetes mellitus was diagnosed based on current American Diabetes Association criteria. Glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}) was determined using high-performance liquid chromatography.

Insulin secretion was determined in the Chikuma cohort, and serum immunoreactive insulin was determined using an insulin-specific radioimmunoassay⁴ at 0, 30, and 120 minutes during the OGTT. In the Aizawa cohort, median age was 52, fasting plasma glucose (PG) was 5.1 mmol/L, 2-hour PG was 6.7 mmol/L, BMI was 23.1 kg/m², and HbA_{1c} was 5.6% (38 mmol/mol). The prevalence of diabetes mellitus was 8.2%.

Prevalence of diabetes mellitus increased with age (<45, 2.5%; 45-54, 5.4%; 55-64, 12.1%; ≥65, 16.8%; P for trend <.01). There was a clear age-associated decline in BMI in individuals with diabetes mellitus (BMI = 31.4 - 0.11·age; coefficient of determination (r^2) = 0.08, $P < .001$); whereas there was a modest, albeit significant, increase in BMI with age in individuals without diabetes mellitus (BMI = 22.8 + 0.01·age; r^2 = 0.0006, P = .01). As a result, the difference in BMI between those with and without diabetes mellitus grew progressively smaller with age. The area under the receiver operating characteristic curve (AUC) in elderly adults was only marginally greater than 0.5, indicating an equivocal association between BMI and diabetes mellitus (Table 1). The mean AUC according to 4-fold cross-validation was 0.790 in those younger than 45, 0.710 in those aged 45-54, 0.620 in those aged 55-64,

3. Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 modulates the postprandial metabolism of advanced glycation end products in elderly men and women

Translational Section

The Mediterranean Diet

Original Article

Mediterranean Diet Supplemented With Coenzyme Q₁₀ Modulates the Postprandial Metabolism of Advanced Glycation End Products in Elderly Men and Women

Javier Lopez-Moreno,^{1,2} Gracia M. Quintana-Navarro,^{1,2} Javier Delgado-Lista,^{1,2} Antonio Garcia-Rios,^{1,2} Juan F. Alcala-Diaz,^{1,2} Francisco Gomez-Delgado,^{1,2} Antonio Camargo,^{1,2} Pablo Perez-Martinez,^{1,2} Francisco J. Tinahones,^{2,3} Gary E. Striker,^{4,5} Francisco Perez-Jimenez,^{1,2} Jose M. Villalba,⁶ Jose Lopez-Miranda,^{1,2,*} and Elena M. Yubero-Serrano^{1,2,*}

¹Lipids and Atherosclerosis Unit, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Spain. ²CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ³Biomedical Research Institute of Malaga (IBIMA), Virgen de la Victoria Hospital, University of Malaga, Spain. ⁴Division of Experimental Diabetes and Aging, Department of Geriatrics and ⁵Division of Nephrology, Department of Medicine, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York. ⁶Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, Spain.

*These authors equally contributed to this work.

Address correspondence to Elena M. Yubero-Serrano, PhD, Lipids and Atherosclerosis Unit, Reina Sofia University Hospital, Avda. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba, Spain. E-mail: helese35@hotmail.com

Received May 24, 2016; Accepted October 8, 2016

Decision Editor: Rafael de Cabo, PhD

Abstract

Advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress are elevated with aging and dysmetabolic conditions. Because a Mediterranean (Med) diet reduces oxidative stress, serum AGEs levels, and gene expression related to AGEs metabolism in healthy elderly people, we studied whether supplementation with coenzyme Q₁₀ (CoQ) was of further benefit. Twenty participants aged ≥ 65 (10 men and 10 women) were randomly assigned to each of three isocaloric diets for successive periods of 4 weeks in a crossover design: Med diet, Med + CoQ, and a Western high-saturated-fat diet (SFA diet). After a 12-hour fast, volunteers consumed a breakfast with a fat composition similar to the previous diet period. Analyses included dietary AGEs consumed, serum AGEs and AGE receptor-1 (AGER1), receptor for AGEs (RAGE), glyoxalase I (GloxI), and estrogen receptor α (ERα) mRNA levels. Med diet modulated redox-state parameters, reducing AGEs levels and increasing AGER1 and *GloxI* mRNA levels compared with the SFA diet. This benefit was accentuated by adding CoQ, in particular, in the postprandial state. Because elevated oxidative stress/inflammation and AGEs are associated with clinical disease in aging, the enhanced protection of a Med diet supplemented with CoQ should be assessed in a larger clinical trial in which clinical conditions in aging are measured.

Keywords: Oxidative stress—Coenzyme Q₁₀—Mediterranean diet—Age-related diseases—Advanced glycation end products

Aging is a biological process characterized by a time-dependent, progressive, and physiological decline, accompanied by an increased incidence of age-related diseases (1).

Both reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress have been pointed out as primary determinants of aging (2). A certain amount of oxidative damage takes place even under normal

conditions, but the rate of this damage increases during pathological conditions such as diabetes, cardiovascular diseases, cancer, or other aging-related diseases (3).

The contribution of advanced glycation end products (AGEs) in the origin and progression of age-associated diseases has been reported, increasing oxidative stress and inflammation, which underlies their pathology (4–6). AGEs constitute a heterogeneous group of compounds derived from the nonenzymatic glycation of proteins, lipids, and nuclear acids via a complex sequence of reactions referred as the Maillard reaction (7). Glyoxal, methylglyoxal (MG), (8) and N-carboxymethyllysine (CML) are the most well-studied AGEs and serve as markers of AGE accumulation in several tissues (9). Small amounts of AGEs are generated in vivo as a normal consequence of metabolism, and they gradually accumulate during aging, especially in the context of associated chronic diseases (10). However, dietary AGEs (dAGEs) are one of the most important exogenous AGEs sources that contribute to the body AGEs pool (11). In this sense, studies in healthy participants on self-selected diets with low or high dAGEs content showed a strong correlation of AGEs intake and serum AGE levels (sAGEs) (12). Consumption of an AGE-restricted diet is an effective method to reduce the body's total AGE concentration and that, in turn, decreases oxidative stress and inflammation in many populations (13,14). AGEs content of a diet depends on the nutrient composition and on the way food is processed (15,16). In fact, there is growing evidence that the Western-style diet, rich in saturated fatty acids (SFA), is a plentiful source of exogenous AGEs (17).

When evaluating the influence of the diet on oxidative stress, most studies analyzed several factors in the fasting state after different dietary regimens. However, fasting is not the typical physiological state of the modern human being, who spends most of their time in a postprandial state (18). Postprandial oxidative stress is characterized by an increase in oxidative stress biomarkers after the intake of a meal (19). In line with this, the Mediterranean diet (Med diet), which is rich in monounsaturated fatty acids (MUFA) and minimally processed natural foods, was found to reduce postprandial oxidative stress and inflammation (20).

Interest in Coenzyme Q₁₀ (CoQ; 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decaprenyl-1,4-benzoquinone) was stimulated by the fact that it may be an additional antioxidant source based on its key role in mitochondrial bioenergetics and its widely studied antioxidant capacity under lipophilic conditions (21).

Aging, poor eating habits, and stress affect the organism's ability to provide adequate amounts of CoQ. Many researchers suggest that using CoQ supplements may help to maintain the health status of elderly people and may also treat some of the age-related diseases. For instance, it might be used as adjunctive therapy in the treatment of congestive heart failure (22) as well as for slowing the progression of Parkinson's disease in its early stages (23).

We previously showed that postprandial oxidative stress was reduced after a Mediterranean diet supplemented with CoQ (Med + CoQ diet) when compared with a SFA-rich diet (24–26). However, the effect of Mediterranean diet and CoQ in the metabolism of AGEs associated with aging has not been established. In this sense, our main aim was to determine whether the Med + CoQ diet may have a favorable effect on the oxidative stress by modifying the levels of sAGEs and the expression of genes related to AGEs metabolism in healthy elderly people.

Methods

Participants and Recruitment

Volunteers were recruited using various methods including general practitioner databases and advertisements by posters and

newspapers. Among those willing to consider entering the study, a total of 63 persons were contacted and showed their willingness to enter the study. Inclusion and exclusion criteria were fulfilled by 20 patients (age ≥ 65 years; 10 men and 10 women). Clinical inclusion criteria were as follows: age ≥ 65 years, body mass index = 20–40 kg/m², total cholesterol concentration ≤ 8.0 mmol/L, and nonsmokers. The clinical exclusion criteria were as follows: age < 65 years, diabetes or other endocrine disorders, chronic inflammatory conditions, kidney or liver dysfunction, iron deficiency anemia (hemoglobin < 12 g/dL men, < 11 g/dL women), prescribed hypolipidemic and anti-inflammatory medication, fatty acid supplements including fish oil, consumers of high doses of antioxidant vitamins (A, C, E, β -carotene), highly trained or endurance athletes or those who participate in more than three periods of intense exercise per week, weight change ≥ 3 kg within the last 3 months, smokers, alcohol, or drug abuse (based on clinical judgment). Forty-three patients were excluded after reviewing the inclusion and exclusion criteria, being the main cause of exclusion the existence of chronic diseases.

Before joining the study, all participants underwent a comprehensive medical history, physical examination, and clinical chemistry analysis and gave informed consent. The study protocol was approved by the Human Investigation Review Committee of the Reina Sofia University Hospital, according to institutional and Good Clinical Practice guidelines (protocol number 772).

Study Design

Participants were randomly assigned to receive, in a crossover design, three sequential isocaloric diets for 4-week periods each. The experimental design of the study was described previously (Supplementary Figure 2) (24–26). Because all participants consumed the three diets, the final sample size was considered to be 60. The three diets were as follows: (a) Mediterranean diet supplemented with CoQ (Med + CoQ diet; ubiquinone: 200 mg/d in capsules), containing 15% of energy as protein, 47% of energy as carbohydrate, and 38% of total energy as fat (24% MUFA [provided by virgin olive oil], 10% SFA, 4% polyunsaturated fatty acid [PUFA]); (b) Mediterranean diet not supplemented with CoQ (Med diet), with the same composition of the first diet but supplemented by placebo capsules; and (c) Western diet rich in saturated fat (SFA diet), with 15% of energy as protein, 47% of energy as carbohydrate, and 38% of total energy as fat (12% MUFA, 22% SFA, 4% PUFA). From the Med/Med + CoQ diets, 80% of the MUFA was provided by virgin olive oil, which was used for cooking, salad dressing, and as a spread. Butter was used as the main source of SFA during the SFA dietary period (Supplementary Table 3).

The cholesterol intake was kept constant (< 300 mg/d) during the three periods. Both the CoQ and the placebo capsules were specially produced by the same company (Kaneka Corporation, Osaka, Japan) and were identical in weight and external aspects. Patients taking the capsules were unaware whether they were in the Med + CoQ or Med dietary period (Supplementary Table 1). The composition of the experimental diets was calculated by using the U.S. Department of Agriculture (1987) food tables and Spanish food-composition tables for local foodstuffs (27,28).

At the end of each dietary intervention period, participants were given a fatty breakfast with the same fat composition as consumed in each of the assigned diets. Patients presented at the clinical centers 8-hours following a 12-hour fast (time 0) and abstained from alcohol intake during the preceding 7 days. A fasting blood sample was taken in the morning, following which the test meal, was ingested within 20 minutes under supervision. Subsequent blood samples were drawn at 4 hours. Test meals provided an equal

amount of fat (0.7 g/kg of body weight), cholesterol (5 mg/kg of body weight), and vitamin A (60,000 IU/m² body surface area). The test meal provided 65% of energy as fat, 10% as protein, and 25% as carbohydrates. The composition of the breakfasts was as follows: Med with CoQ breakfast (400 mg in capsules; 12% SFA, 43% MUFA, 10% PUFA); Med with placebo capsules breakfast (12% SFA, 43% MUFA, 10% PUFA); and SFA-rich breakfast (38% SFA, 21% MUFA, 6% PUFA).

Biochemical Determinations

Serum samples

Samples from each dietary intervention were collected in the fasting state and 4 hours after the meal intake (postprandial state) and stored with particular care to avoid exposure to air and light. Serum was separated from whole blood by centrifugation at 1,500g for 20 minutes at 20°C within 1 hour of extraction.

dAGEs intake

Assessment of dAGEs content was performed using 3-day weighed food diaries emphasizing cooking methods that were completed by the participants, at baseline, Week 2, and Week 4 for each diet. Similarly, dAGEs content was also determined after each test breakfast. Then, dAGEs content was estimated from a database of approximately 560 foods that lists AGE values (16) and was expressed as AGE kilounits per 100-gram food.

Measurement of AGEs

Serum CML and MG (sCML and sMG) were determined by well-validated competitive ELISAs (OxiSelect Methylglyoxal Competitive Elisa Kit and OxiSelect Nε-Carboxymethyllysine Competitive Elisa Kit [Cell Biolabs, San Diego], respectively), which are based on noncross-reactive monoclonal antibodies (mAbs) for protein-bound CML (4G9 mAb) and protein-bound MG derivatives. The immunogens used to generate the mAbs (ie, lysine-MG-H1 [3D11 mAb] and protein-bound CML) were characterized by high-performance liquid chromatography (29). The resulting values reflect relatively stable protein- or peptide-associated CML and MG and not the free compounds. The interassay coefficients of variation were 2.8% and 5.2% for CML and MG, respectively; the intra-assay coefficients of variation were 2.6% and 4.1% for CML and MG, respectively (13).

Isolation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 20 mL of venous blood, at fasting and postprandial states, in tubes containing 1 mg/mL of ethylenediaminetetraacetic acid. The blood samples were diluted 1:1 in phosphate-buffered saline, and cells were separated in Ficoll gradient (Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) by centrifugation at 800g for 25 minutes at 20°C. The cells were collected and washed with cold phosphate-buffered saline two times and finally resuspended in a buffer. The buffer contained 10 mM HEPES, 15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (at the time of use, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM dithiothreitol were added; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The cells thus obtained were stored at -80°C for further analysis.

RNA extraction

Total RNA from PBMCs was extracted using the trizol method according to the recommendations of the manufacturer (Tri Reagent; Sigma-Aldrich) and quantified using a Nanodrop ND-1000 v3.5.2 spectrophotometer (Nanodrop Technology, Cambridge, UK). RNA

integrity was verified on agarose gel electrophoresis and stored at -80°C. Samples were digested with DNase I (AMPD-1 KT; Sigma-Aldrich) before real-time PCR.

Quantitative Real-Time PCR for Gene Expression Analysis

Real-time PCR was carried out using the OpenArray NT Cyclor system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), following the manufacturer's instructions. Each reaction was performed with 1 µL of a 1:5 (v/v) dilution of the first cDNA synthesized from 1 µg of total RNA using the commercial kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. The gene expression analysis was performed on duplicated samples from 20 participants at fasting and at 4 hours after intake of the fat overload. Primer pairs were selected from the database TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems; <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601267>), for the following genes: AGE receptor-1 (*AGER1*), receptor for AGEs (*RAGE*), glyoxalase I (*Glo1*), and estrogen receptor α (*ER α*). The relative expression for each analyzed gene was calculated with *GADPH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) as a housekeeping gene. The data set was analyzed by OpenArray Real-Time qPCR Analysis Software (Applied Biosystems).

Statistical Analysis

PASW Statistics, Version a8, SPSS statistical software (Chicago, IL) was used for statistical analysis. The Kolmogorov-Smirnov test did not show a significant departure from normality in the distribution of variance values. In order to evaluate data variation, Student's *t* test and analysis of variance for repeated measures was performed, followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons, depending on the existence of two or more groups in each comparison. We studied the statistical effects of the type of fat meal ingested, independent of time (represented by *p*₁), the effect of time (represented by *p*₂), and the interaction of both factors (represented by *p*₃). Pearson's correlation analyses were performed to examine the correlations between *AGER1* and *RAGE* mRNA levels and sCML and sMG and other parameters related to inflammation and redox state described in our previous reports (nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2 [*Nrf2*], thioredoxin [*Trx*], NADPH oxidase subunits [*p40^{phox}* and *p67^{phox}*], interleukin-8 [*IL-8*] mRNA levels, and plasmatic nitric oxide, 8-isoprostanes, and protein carbonyls levels) (24,26). Differences were considered to be significant when *p* < .05. All data presented in text and tables are expressed as means \pm SE.

Results

Baseline Characteristics of the Study Population

All participants completed the three dietary intervention periods. Men had higher height, waist circumference, triglyceride, and Apo B than women. There were no other differences by gender (Supplementary Table 2).

dAGEs Consumed in Each Dietary Intervention

Med diet (with or without CoQ supplementation) and SFA diet differed in quality fat composition, and this was mirrored by differences in dAGEs levels (Figure 1A and B). In both the fasting and postprandial phase after SFA diet, participants consumed a higher amount of dAGEs compared with Med or Med + CoQ diets (all *p* < .05; Figure 1A and B). There were no differences in the amount of food-related AGEs between Med and Med + CoQ diets (Figure 1A).

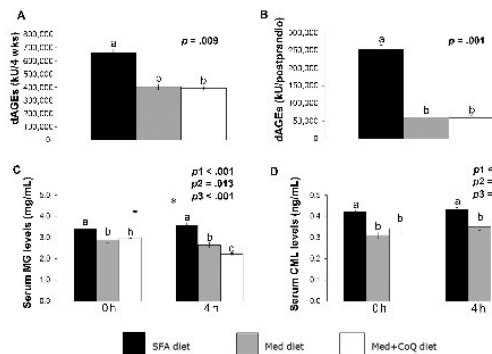


Figure 1. dAGEs levels consumed after 4 weeks of each dietary intervention (A) and after 4-hour postprandial state (B). Fasting and postprandial levels of MG (C) and CML (D) in serum samples according to the different diets consumed. Data were analyzed using ANOVA for repeated measures. All values represent the mean \pm SE. Bars with different superscript letters depict statistically significant differences. *Differences between fasting and postprandial phase ($p < .05$). $p1$: diet effect, $p2$: time effect, $p3$: diet \times time interaction. AGEs = advanced glycation end products; ANOVA = analysis of variance; CML = N-carboxymethyllysine; CoQ = coenzyme Q₁₀; dAGEs = dietary advanced glycation end products; Med = Mediterranean; MG = methylglyoxal; SFA = saturated fat.

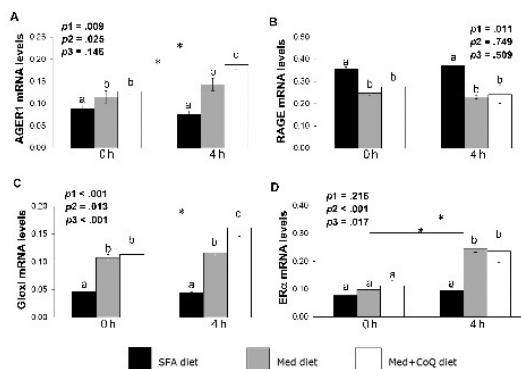


Figure 2. Fasting and postprandial levels of AGER1 mRNA (A), RAGE mRNA (B), GLOX1 mRNA (C), and ERα mRNA (D) in PBMCs according to the different diets consumed. Data were analyzed using ANOVA for repeated measures. All values represent the mean \pm SE. Bars with different superscript letters depict statistically significant differences. *Differences between fasting and postprandial phase ($p < .05$). $p1$: diet effect, $p2$: time effect, $p3$: diet \times time interaction. AGER1 = advanced glycation end product receptor-1; ANOVA = analysis of variance; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; RAGE = receptor for AGEs.

Plasma CoQ and Serum AGEs Levels After Each Dietary Intervention

Fasting and postprandial plasma CoQ levels were higher after Med + CoQ diet compared with the other diets (all $p < .05$). Moreover, Med + CoQ diet produced an increase in plasma CoQ levels during the postprandial phase compared with fasting state ($p = .019$; Supplementary Figure 1). Conversely, fasting sMG and sCML levels were higher after SFA diet compared with both Med and Med + CoQ diets (all $p < .05$; Figure 1C and D). Furthermore, Med + CoQ diet produced lower postprandial sMG and sCML levels compared

with Med diet ($p = .013$ and $.019$, respectively). We also observed lower postprandial levels of both sAGEs forms after Med diet compared with SFA diet ($p = .005$ and $.009$, respectively; Figure 1C and D). Interestingly, sMG levels decreased significantly during the postprandial phase when compared with the fasting state in the Med + CoQ diet group ($p = .023$) but were unchanged in the Med group and were even increased in SFA group (Figure 1C).

Dietary Intake and Expression of Genes Related to Receptors for AGEs in PBMCs

The antioxidant properties of AGER1 are due to the fact that it reduces AGE levels in the intracellular and extracellular spaces (13,14). Conversely, cell surface RAGE binds AGEs and induces the generation of ROS and promotes an inflammatory response (30). Med and Med + CoQ diets produced higher fasting and postprandial AGER1 mRNA levels and lower fasting and postprandial RAGE mRNA levels compared with SFA diet. However, we observed higher postprandial AGER1 mRNA levels after Med + CoQ diet compared with Med diet (all $p < .05$; Figure 2A and B). We did not find differences on fasting and postprandial RAGE mRNA levels between Med + CoQ and Med diets (Figure 2B). Conversely, Med and Med + CoQ diets produced an increase in AGER1 mRNA levels, during the postprandial phase compared with the fasting state ($p = .025$ and $.006$, respectively), whereas consumption of the SFA diet resulted in a decrease of postprandial AGER1 mRNA levels in comparison with the fasting state (Figure 2A).

Dietary Intake and Expression of Genes Related to AGE Metabolism and Oxidative Stress in PBMCs

GLOX1 detoxifies reactive α -oxoaldehyde, thereby removing AGEs, particularly MG (31). In addition, AGEs have been implicated in the reduction in number and function of estrogen receptors (ERs) (32).

Med and Med + CoQ diets produced higher fasting and postprandial GLOX1 mRNA levels and higher postprandial ERα mRNA levels compared with SFA diet (all $p < .05$; Figure 2C and D). There were no differences in fasting ERα mRNA levels among the three diets. Conversely, Med + CoQ diet produced higher postprandial GLOX1 mRNA levels compared with Med diet ($p = .018$; Figure 2C).

Conversely, Med diet produced an increase in ERα mRNA levels, and both Med and Med + CoQ diets produced an increase in GLOX1 mRNA levels, during the postprandial phase compared with fasting state (all $p < .05$) but not after SFA diet (Figure 2C and D).

Relationship Between AGEs and Inflammatory and Redox-State-Related Parameters

Figures 3 and 4 show the correlation results for the relationship between AGER1 and RAGE mRNA levels and parameters related to redox state and inflammation. A univariate analysis showed a moderate positive correlation between AGER1 mRNA levels and Nrf2 mRNA levels ($r = .396$; $p = .018$), nitric oxide levels ($r = .401$; $p = .010$) and Trx mRNA levels ($r = .444$; $p = .002$), a moderate negative correlation with protein carbonyl levels ($r = -.305$; $p = .032$), and a weak negative correlation with 8-isoprostanes levels ($r = -.299$; $p = .024$). As anticipated, RAGE mRNA levels showed a strong positive correlation with IL-8 mRNA levels ($r = .511$; $p = .003$) and 8-isoprostanes levels ($r = .613$; $p = .011$), and a moderate positive correlation with sMG content ($r = .301$; $p = .007$) and gene expression of a subunit of NADPH oxidase such as p67^{phox} mRNA levels ($r = .361$; $p = .001$).

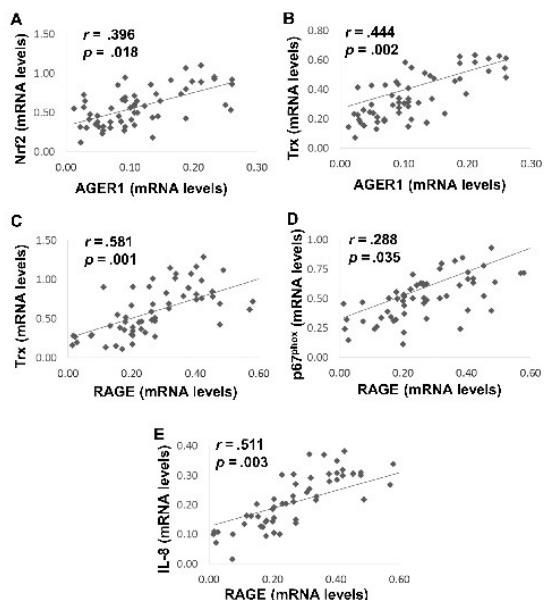


Figure 3. Correlation analysis between AGER1 and RAGE mRNA levels and expression of genes related to oxidative stress/inflammation, in PBMCs. r (correlation coefficient) has been determined by Pearson's method; $p < .05$ is considered significant. AGER1 = advanced glycation end product receptor-1; p67^{phox} = subunit of NADPH oxidase; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; RAGE = receptor for AGEs; Trx = thioredoxin.

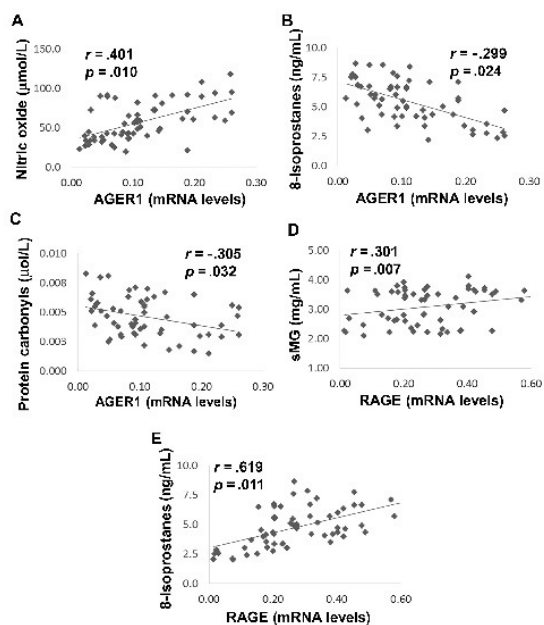


Figure 4. Correlation analysis between AGER1 and RAGE mRNA levels and plasma and serum oxidative stress/inflammation-related variables. r (correlation coefficient) has been determined by Pearson's method; $p < .05$ is considered significant. AGER1 = advanced glycation end product receptor-1; RAGE = receptor for AGEs; sMG = serum methylglyoxal.

Discussion

Recent knowledge points toward high levels of ROS and oxidative stress as the primary determinants of aging, together with low levels of CoQ present during the aging process, explain the fact of selecting an elderly population in our study. Conversely, current dietary habits would predict that modern-day humans spend most of the time in the postprandial state (18), which is known to be a stressful condition because this is the time in which an oxidative stress situation normally occurs (19). Therefore, the postprandial phase is probably one of the most essential periods to reveal the healthy or detrimental effects of dietary interventions by studying variations in oxidative stress.

In this sense, our results corroborated the antioxidant and anti-inflammatory effects of the consumption of a Med diet, both in fasting and postprandial states (20). Moreover, the addition of the CoQ to a Med-style diet provides an additional beneficial effect of reducing the oxidative and inflammatory state, particularly in the postprandial phase (24,26). Here, we have shown for the first time that CoQ supplementation resulted in a greater decrease in endogenous AGEs levels, sMG and sCML, during postprandial state, which is likely a consequence of an increase in gene expression related with AGEs metabolism, *AGER1* and *Glo1*. Although other clinical studies have been focused on the antioxidant effects of CoQ, the current study is the first cross-randomized controlled dietary trial that analyzes the effect of supplementation with CoQ on AGEs during the postprandial phase in an aged population. Another novel feature of this study is the correlations between the diets and the metabolism of AGEs.

Several studies have shown that a low-AGE diet reduced circulating AGE levels and chronic inflammation/oxidative stress in patients with age-related diseases (4,14). The current study extends these previous data and shows that consumption of Med diet, with or without supplementation with CoQ, provided lower dAGEs content compared with SFA diet. Med diet components (MUFA, α -tocopherol, phenolic compounds, or phytoesters) could provide the antioxidant capacity of this diet, suggesting its direct association with a decrease of oxidative stress (33). Previous studies showed that sAGEs levels are directly related to AGEs consumed via the diet (34), a finding that is corroborated by the current study. In contrast, consumption of SFA diet, with higher content in dAGEs, was associated with increased sMG and sCML levels. Dietary intervention studies demonstrated that SFA-rich diets contain elevated quantities of AGEs with adverse consequences on health (4,35).

In response to high AGEs levels, the host defense system employs different mechanisms to restrict their toxicity. The glyoxalase system (mainly GloxI and GloxII) (11) and AGER1/RAGE receptors have been shown to be a part of the innate and adaptive defense that serve to respond to AGEs. GloxI is an important regulator of the control of intracellular AGEs because it binds and detoxifies AGEs formed during normal metabolism. AGER1 binds extracellular AGEs and delivers them to the lysosomes where they are detoxified (30), thus reducing AGE-related ROS and inflammation (13,36). Another means of reducing extracellular AGEs levels is provided by circulating RAGE because it binds AGEs. However, after this binding, RAGE induces oxidative stress/inflammation, and thus, it can be considered as a deleterious response (37). These defense mechanisms are reduced in aging and other age-related diseases, resulting in suppression of the antioxidant defense system and increased levels of pro-oxidant mechanisms, which results in a further increase in AGEs levels, ROS, and finally leads to tissue injury (29). The current

study supports these findings and other previous studies showing that sAGEs serve as stimuli for changes in gene expression. Namely, higher *AGER1* and *Glox1* mRNA levels and the lower *RAGE* mRNA levels observed in participants with the Med diet intake could also explain the reduction in sMG and sCML levels compared with the SFA diet.

Although both Med and Med + CoQ diets contained similar levels of dAGEs, supplementation of a Med diet with CoQ led to further reductions in the postprandial levels of sMG and sCML accompanied by increased *AGER1* and *Glox1* mRNA levels. Besides being part of the mammalian mitochondrial electron transport chain, CoQ is related with protection and elimination of oxidative damage due its antioxidant properties in all cell membranes preventing lipid peroxidation and participating in the regeneration of other antioxidants, such as α -tocopherol (38). Although the reduced form of this molecule, ubiquinol, is the one that acts as a potent lipid-soluble antioxidant scavenging free-radical species and regenerating the active form of other antioxidants (21), our study showed a high protection of the redox state when a Med diet was supplemented with ubiquinone, the oxidized form. In accordance, efficient mechanisms for reduction of CoQ seem to be present in the blood, and the majority of this compound is in the reduced state even after a fourfold elevation of concentration on dietary supplementation with its oxidized form (39).

CoQ deficiency results in an impairment of the assembly and/or stability of the respiratory chain enzymes, which leads to imbalanced oxidative phosphorylation and enhanced ROS production (40), and a reduced cell capacity against oxidative damage (38). Therefore, the addition of CoQ to the diet could be expected to enhance respiratory chain activity, reduce ROS production, and protect from protein oxidation and lipid peroxidation (41), outcomes that could contribute to a reduction in the formation of endogenous AGEs. This ultimately might lead to preservation of anti-AGE defenses (*Glox1* and *AGER1*).

Although estrogen levels are decreased in aging, they remain sufficient to stimulate ERs, suggesting that the insensitivity to estrogen in the postmenopausal period is due to the decrease in number and function of ERs (32). Several studies have implicated AGEs in ER α inhibition (6,42). ER α mRNA levels were increased in those participants consuming the Med and Med + CoQ diets. Moreover, Med and Med + CoQ diets contained the lowest levels of AGEs and contributed to a reduction of sAGEs levels, which may have led to the increased postprandial ER α mRNA levels in these participants.

The oxidant and inflammatory action of circulating AGEs is normally controlled by *AGER1*, considered as the main host defense against glycoxidants, whereas the AGEs binding to *RAGE* produces the activation of inflammatory and immune responses, which finally leads to cell damage (29,36). In this way, *AGER1* mRNA levels were mainly associated with genes/markers related to antioxidant defenses (a moderate correlation with *Nrf2* and *Trx* mRNA and plasma nitric oxide levels), whereas *RAGE* mRNA levels showed associations with inflammatory/oxidative markers (a strong correlation with *IL-8* mRNA and 8-isoprostanes levels, and a moderate correlation with sMG and *p67^{phox}* mRNA levels, a subunit of NADPH oxidase enzyme, related to ROS production in the cell).

The present study has the advantage of a randomized crossover design in which all the participants have experienced the three diet periods, each individual acting as his/her own control and strengthening the fact that the effects observed are indeed due to the influence of the type of diet. Our study has certain limitations because ensuring adherence to dietary instructions is difficult in a feeding

trial. However, adherence to the recommended dietary patterns was satisfactory, as can be judged by the measurements of compliance.

In conclusion, our results support the protective effect of a Med diet against oxidative stress/inflammation, and this protection is enhanced by supplementing with CoQ, thus reducing postprandial circulating AGEs levels and modulating the expression of genes related to AGEs metabolism in elderly men and women. This fact may be a good starting point for assessing the benefits of both consuming low-AGE diets and the use of CoQ on clinical features associated to age.

Supplementary Material

Supplementary data is available at *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* online.

Funding

This work was supported in part by research grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2004-07907, AGL2006-01979, and AGL2009-12270), Ministerio de Ciencia y Competitividad (AGL2012-39615 to J.L.-M., FIS PI10/01041 to P.P.-M., and FIS PI13/00023 to J.D.-L.), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P06-CTS-01425 and PI0193/09 to J.L.-M., PI-0252/09 to J.D.-L., and PI-0058/10 to P.P.-M.), Proyecto de Excelencia, Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo (CVI-7450 to J.L.-M.); Merck Serono and Fundación 2000 (Clinical Research in Cardiometabolic to P.P.-M.).

Acknowledgments

The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. The authors' responsibilities were as follows: J.L.-M. and F.P.-J. designed research and conducted research; J.D.-L., A.G.-R., J.F.A.-D., F.G.-D., P.P.-M., and J.L.-M. provided materials or participants; J.L.-M., A.C., J.F.A.-D., G.M.Q.-N., and E.M.Y.-S. collected and assembled data; J.L.-M. and E.M.Y.-S. analyzed data; J.L.-M. and E.M.Y.-S. wrote the manuscript; G.E.S., J.D.-L., F.J.-T., and P.P.-M. provided significant advice and support in reviewing the drafting of the manuscript; J.L.-M. and E.M.Y.-S. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

1. Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009. *Biogerontology*. 2009;10:773–781. doi:10.1007/s10522-009-9234-2
2. Dröge W. The plasma redox state and ageing. *Ageing Res Rev*. 2002;1:257–278.
3. Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2:259–269. doi:10.4161/oxim.2.5.9441
4. Cai W, Uribarri J, Zhu L, et al. Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:4940–4945. doi:10.1073/pnas.1316013111
5. Vlassara H, Cai W, Chen X, et al. Managing chronic inflammation in the aging diabetic patient with CKD by diet or sevelamer carbonate: a modern paradigm shift. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67:1410–1416. doi:10.1093/gerona/gls195
6. Yubero-Serrano EM, Woodward M, Poretzky L, Vlassara H, Striker GE; AGE-less Study Group. Effects of sevelamer carbonate on advanced glycation end products and antioxidant/pro-oxidant status in patients

- with diabetic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10:759–766. doi:10.2215/CJN.07750814
7. O'Brien J, Morrissey PA. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1989;28:211–248. doi:10.1080/10408398909527499
 8. Thornalley PJ. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol*. 1996;27:565–573.
 9. Arsov S, Graaff R, van Oeveren W, et al. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52:11–20. doi:10.1515/ccm-2012-0832
 10. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010;65:963–975. doi:10.1093/gerona/gdq074
 11. Vlassara H, Cai W, Crandall J, et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:15596–15601. doi:10.1073/pnas.242407999
 12. Uribarri J, Cai W, Peppas M, et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007;62:427–433.
 13. Vlassara H, Cai W, Goodman S, et al. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:4483–4491. doi:10.1210/jc.2009-0089
 14. Uribarri J, Cai W, Ramdas M, et al. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care*. 2011;34:1610–1616. doi:10.2337/dc11-0091
 15. Goldberg T, Cai W, Peppas M, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc*. 2004;104:1287–1291. doi:10.1016/j.jada.2004.05.214
 16. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc*. 2010;110:911–916.e12. doi:10.1016/j.jada.2010.03.018
 17. Sebeková K, Krajčovičová-Kudláčková M, Schinzel R, Faist V, Klvanová J, Heidland A. Plasma levels of advanced glycation end products in healthy, long-term vegetarians and subjects on a western mixed diet. *Eur J Nutr*. 2001;40:275–281.
 18. de Koning EJ, Rabelink TJ. Endothelial function in the post-prandial state. *Atheroscler Suppl*. 2002;3:11–16.
 19. Cardona F, Túnez I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ. Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:510–515. doi:10.1111/j.1365-2362.2008.01959.x
 20. Yubero-Serrano EM, García-Ríos A, Delgado-Lista J, et al. Postprandial effects of the Mediterranean diet on oxidant and antioxidant status in elderly men and women. *J Am Geriatr Soc*. 2011;59:938–940. doi:10.1111/j.1532-5415.2011.03381.x
 21. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1660:171–199.
 22. Kaikkonen J, Tuomainen TP, Nyyssonen K, Salonen JT. Coenzyme Q10: absorption, antioxidative properties, determinants, and plasma levels. *Free Radic Res*. 2002;36:389–397.
 23. Müller T, Büttner T, Gholipour AF, Kuhn W. Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2003;341:201–204.
 24. Yubero-Serrano EM, Gonzalez-Guardia L, Rangel-Zuñiga O, et al. Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 modifies the expression of proinflammatory and endoplasmic reticulum stress-related genes in elderly men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67:3–10. doi:10.1093/gerona/glr167
 25. Yubero-Serrano EM, Delgado-Casado N, Delgado-Lista J, et al. Postprandial antioxidant effect of the Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 in elderly men and women. *Age (Dordr)*. 2011;33:579–590. doi:10.1007/s11357-010-9199-8
 26. Yubero-Serrano EM, Gonzalez-Guardia L, Rangel-Zuñiga O, et al. Postprandial antioxidant gene expression is modified by Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q(10) in elderly men and women. *Age (Dordr)*. 2013;35:159–170. doi:10.1007/s11357-011-9331-4
 27. Varela G. *Tablas de Composición de Alimentos (Food Composition Tables)*. Madrid, Spain: Instituto de Nutrición CSIC; 1980.
 28. Human Nutrition Information Service. *Composition of Foods*. Washington, DC: US Government Printing Office, Department of Agriculture; 1987.
 29. Cai W, Ramdas M, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:15888–15893. doi:10.1073/pnas.1205847109
 30. Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7:526–539. doi:10.1038/nrendo.2011.74
 31. Uribarri J, Cai W, Woodward M, et al. Elevated serum advanced glycation endproducts in obese indicate risk for the metabolic syndrome: a link between healthy and unhealthy obesity? *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:1957–1966. doi:10.1210/jc.2014-3925
 32. Potier M, Karl M, Zheng F, Elliot SJ, Striker GE, Striker LJ. Estrogen-related abnormalities in glomerulosclerosis-prone mice: reduced mesangial cell estrogen receptor expression and proclerotic response to estrogens. *Am J Pathol*. 2002;160:1877–1885. doi:10.1016/S0002-9440(10)61134-0
 33. Visoli F, Galli C. The role of antioxidants in the Mediterranean diet. *Lipids*. 2001;36(suppl):S49–S52.
 34. Delgado-Andrade C, Tessier FJ, Niquet-Leridon C, Sciquer I, Pilar Navarro M. Study of the urinary and faecal excretion of Nε-carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino Acids*. 2012;43:595–602. doi:10.1007/s00726-011-1107-8
 35. Uribarri J, Cai W, Pyzik R, et al. Suppression of native defense mechanisms, SIRT1 and PPARγ, by dietary glycoxidants precedes disease in adult humans; relevance to lifestyle-engendered chronic diseases. *Amino Acids*. 2014;46:301–309. doi:10.1007/s00726-013-1502-4
 36. Vlassara H, Striker G. Glycotoxins in the diet promote diabetes and diabetic complications. *Curr Diab Rep*. 2007;7:235–241.
 37. Coughlan MT, Thorburn DR, Penfold SA, et al. RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:742–752. doi:10.1681/ASN.2008.050514
 38. López-Lluch G, Rodríguez-Aguilera JC, Santos-Ocaña C, Navas P. Is coenzyme Q a key factor in aging? *Mech Ageing Dev*. 2010;131:225–235. doi:10.1016/j.mad.2010.02.003
 39. Dallner G, Sindelar PJ. Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:285–294.
 40. Quinzii CM, López LC, Von-Moltke J, et al. Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J*. 2008;22:1874–1885. doi:10.1096/fj.07-100149
 41. Imada I, Sato EF, Kira Y, Inoue M. Effect of CoQ homologues on reactive oxygen generation by mitochondria. *Biofactors*. 2008;32:41–48.
 42. Mukherjee TK, Reynolds PR, Hoidal JR. Differential effect of estrogen receptor alpha and beta agonists on the receptor for advanced glycation end product expression in human microvascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1745:300–309. doi:10.1016/j.bbamer.2005.03.012

4. Effect of dietary lipids on endotoxemia influences postprandial inflammatory response

Effect of Dietary Lipids on Endotoxemia Influences Postprandial Inflammatory Response

Javier López-Moreno,^{†,‡} Sonia García-Carpintero,^{†,‡} Rosa Jimenez-Lucena,^{†,‡} Carmen Haro,^{†,‡} Oriol A. Rangel-Zúñiga,^{†,‡} Ruth Blanco-Rojo,^{†,‡} Elena M. Yubero-Serrano,^{†,‡} Francisco J. Tinahones,^{‡,§} Javier Delgado-Lista,^{†,‡} Pablo Pérez-Martínez,^{†,‡} Helen M. Roche,^{||} José López-Miranda,^{*,†,‡,⊥} and Antonio Camargo^{*,†,‡,⊥}

[†]Lipids and Atherosclerosis Research Unit, Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, 14004 Cordoba, Spain

[‡]CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, 14004 Cordoba, Spain

[§]Endocrinology and Nutrition Service, Hospital Virgen de la Victoria, 29010 Málaga, Spain

^{||}UCD Institute of Food & Health/UCD Conway Institute, School of Public Health and Population Sciences, University College Dublin, Dublin 4, Ireland

Supporting Information

ABSTRACT: Metabolic syndrome (MetS) results in postprandial metabolic alterations that predisposes one to a state of chronic low-grade inflammation and increased oxidative stress. We aimed to assess the effect of the consumption of the quantity and quality of dietary fat on fasting and postprandial plasma lipopolysaccharides (LPS). A subgroup of 75 subjects with metabolic syndrome was randomized to receive 1 of 4 diets: HSFA, rich in saturated fat; HMUFA, rich in monounsaturated fat; LFHCC n-3, low-fat, rich in complex carbohydrate diet supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids; LFHCC low-fat, rich in complex carbohydrate diet supplemented with placebo, for 12 weeks each. We administered a fat challenge reflecting the fatty acid composition of the diets at postintervention. We determined the plasma lipoproteins and glucose and gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and adipose tissue. LPS and LPS binding protein (LBP) plasma levels were determined by ELISA, at fasting and postprandial (4 h after a fat challenge) states. We observed a postprandial increase in LPS levels after the intake of the HSFA meal, whereas we did not find any postprandial changes after the intake of the other three diets. Moreover, we found a positive relationship between the LPS plasma levels and the gene expression of IkBa and MIF1 in PBMC. No statistically significant differences in the LBP plasma levels at fasting or postprandial states were observed. Our results suggest that the consumption of HSFA diet increases the intestinal absorption of LPS which, in turn, increases postprandial endotoxemia levels and the postprandial inflammatory response.

KEYWORDS: dietary fat, endotoxemia, inflammation, Lipgene, metabolic syndrome

■ INTRODUCTION

Metabolic syndrome (MetS) is defined as a cluster of multiple risk factors of metabolic origin interrelated each other's, which increase the risk of cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes (T2D).¹ The etiology of MetS is the result of the interaction between genetic, metabolic, and environmental factors. Among the environmental factors are considered the dietary habits and, specifically, the quality of dietary fat.²

MetS is considered a postprandial disease, as MetS patients exhibit an exaggerated increase in plasma triglycerides (TG) levels³ and abnormalities in lipoprotein metabolism during the postprandial state.⁴ Recently we have observed the relationship between the magnitude of the postprandial lipemia and the presence of MetS in human. In fact, we observed a parallelism between the number of metabolic syndrome criteria and the postprandial levels of TG.⁵ Moreover, it has been described in human that the rise in postprandial TG is related with the increase in oxidative stress and an inflammatory response and the subsequent increase in the recruitment and activation of macrophages.⁶ Inflammatory biomarkers are challenging in

terms of their labile nature, which may be partly overcome in response to postprandial challenges in human.⁷ Importantly, the postprandial state reflects the metabolic-inflammatory state, as humans are in postprandial state most of the day, because the intake of consecutive meals that overlap during the day.³

Diet, and particularly dietary fat, may modulate the postprandial inflammatory response. Previously, we observed in human that butter-rich foods increased the postprandial expression of proinflammatory cytokines in PBMC as compared with consumption of olive oil-rich foods, as the main source of fat in the Mediterranean Diet, or nuts.⁸ In addition, the Mediterranean diet, as a dietary pattern, reduces the activation in PBMC of transcription factor NFkB compared with the typical saturated fat-rich Western diet.⁹ Furthermore, several other studies in human have shown that the

Received: April 26, 2017

Revised: August 9, 2017

Accepted: August 9, 2017

Published: August 9, 2017

Table 1. Baseline Characteristics of Subjects with the MetS Assigned to Each Diet^a

	HSFA (n = 17)	HMUFA (n = 18)	LFHCC (n = 20)	LFHCC n-3 (n = 20)	P-value
age	58.6 ± 1.9	54.6 ± 1.9	56.4 ± 1.9	55.3 ± 1.5	0.435
BMI (kg/m ²)	35.3 ± 0.9	34.5 ± 0.9	35.4 ± 0.7	35.0 ± 0.8	0.856
WP (cm)	110.9 ± 2.1	106.4 ± 1.9	107.9 ± 2.3	108.9 ± 1.9	0.507
CT (mg/dL)	200.0 ± 9.9	189.1 ± 7.0	207.2 ± 10.4	189.5 ± 8.0	0.405
TG total (mg/dL)	171.1 ± 33.3	143.7 ± 13.4	144.5 ± 13.0	138.4 ± 14.3	0.654
LDL-c (mg/dL)	136.1 ± 7.7	131.6 ± 5.7	147.6 ± 8.6	131.5 ± 7.7	0.374
HDL-c (mg/dL)	43.2 ± 2.5	44.6 ± 2.4	44.6 ± 2.3	42.1 ± 1.9	0.834
glucose (mg/dL)	109.9 ± 3.9	112.3 ± 4.5	102.8 ± 2.3	117.8 ± 7.2	0.173

^aValues presented are the mean ± S.E.M of each diet group. Abbreviations: HSFA, SFA-rich diet; HMUFA, MUFA-rich diet; LFHCC, low fat, high-complex carbohydrate diet with placebo; LFHCC n-3, low fat, high-complex carbohydrate diet with 1.24 g/d long chain n-3 PUFA diet; BMI, body mass index; WP, waist perimeter; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; LDL-c, low density lipoprotein-cholesterol; HDL-c, high density lipoprotein-cholesterol. P values correspond to ANOVA statistical analysis.

response. ANOVA for repeated measures, with diet as the within-subjects factor, was performed to determine the effect of fat quantity and quality in fasting state and to determine the effect of the dietary intervention on the postprandial state. The posthoc statistical analysis was completed using Bonferroni multiple comparison test, as previously published.²⁴ We considered significantly a probability of less than 0.05. We performed a study of the relationships at the postprandial state between LPS and LBP plasma levels and gene expression as expressed as a relative expression in PBMC and adipose tissue by Pearson's linear correlation coefficient.

RESULTS

Characteristics of Patients at Baseline. We observed no statistically significant differences in the various metabolic parameters and baseline characteristics measured between the four experimental groups allocated to each diet (Table 1).

Postprandial Endotoxemia Determined by the Amount and Type of Fat in the Postprandial Dietary Challenge. Interestingly, fasting plasma LPS and LBP levels were not significantly altered by feeding either high-fat diets (HSFA, HMUFA) or both diets low-fat, high-complex carbohydrate (LFHCC, LFHCC n-3) with differing fatty acid composition for 12 weeks in subjects with the MetS (Table 2).

Table 2. Fasting Levels of LPS and LBP after 12 Week of Dietary Intervention^a

diet	LPS (EU/mL)	LBP (μg/mL)
HSFA	0.210 ± 0.033	8.86 ± 1.47
HMUFA	0.477 ± 0.192	9.18 ± 2.11
LFHCC	0.351 ± 0.138	8.83 ± 1.22
LFHCC n-3	0.401 ± 0.136	9.75 ± 1.39
p-value	0.610	0.970

^aMean (± SEM) of LPS (EU/mL) and LBP (μg/mL) plasma levels at 12-h fasting post-intervention. Differences between diet were assessed by One-ANOVA statistical analysis. HSFA, high-saturated fatty acid rich diet; HMUFA, high-monounsaturated fatty acid rich diet; LFHCC, low-fat high-complex carbohydrate diets; LFHCC n-3, low-fat high-complex carbohydrate diet supplemented with n-3 PUFA.

However, there was a marked difference between diets observed in response to the corresponding postprandial challenge. The HSFA meal (fed following the HSFA diet) induced a profound increase in postprandial LPS levels ($p = 0.009$) (Figure 1). In contrast neither HMUFA nor LFHCC challenges significantly altered the postprandial LPS response changes.

Fasting plasma LBP levels were not altered by long-term dietary fat modification (Table 2). Also the postprandial LBP

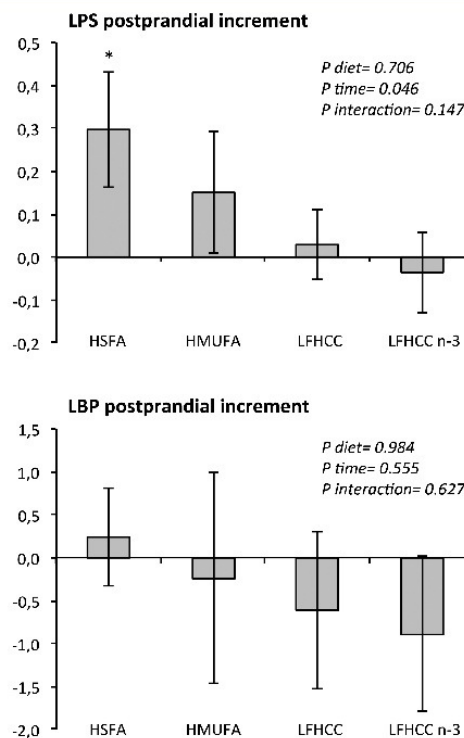


Figure 1. Postprandial increases in LPS and LBP levels. Mean (± SEM) of LPS (EU/mL) and LBP (μg/mL) differences between the plasma levels at postintervention, 12-h fasting and postintervention, 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the HSFA, HMUFA, LFHCC, or LFHCC n-3 diets. ANOVA for repeated measures, global p-values: P diet, diet effect; P time, time effect; P interaction, diet by time interaction. * $p < 0.05$ between fasting and postprandial in the Post Hoc Bonferroni's multiple comparison tests.

response to the corresponding postprandial dietary challenge was not significantly different between diets. Nevertheless it is important to note that there was a significant negative correlation between the levels of LPS and LBP ($R = -0.391$; $p = 0.001$). This is suggestive of an important biological inter-relationship.

Mediterranean diet may reduce the pro-inflammatory response.¹⁰

Studies in animal models have shown that intestinal fat absorption promotes the absorption of endotoxins at the intestinal level, such as the highly pro-inflammatory lipopolysaccharides (LPS), which may be partially responsible for, or may enhance, the postprandial inflammatory response.¹¹ Studies in humans have shown that there is no age differences in plasma endotoxin levels after a meal high in fat,¹² and endotoxin levels are very low and mostly undetectable in some populations.¹³ It has been shown in humans that a fruit and fiber-rich meal (carbohydrates 58%, protein 15%, and fat 27%) induce reduced postprandial LPS levels as compared with a high-fat (33% saturated) meal (carbohydrates 50.5%, protein 20%, and fat 29.5%).¹⁴ Moreover, it has been shown that the n-3 fatty acid rich test meal reduces postprandial serum endotoxin as compared with the meal rich in saturated fatty acid.¹⁵ Also, we have demonstrated in humans that the phenolic content of virgin olive oil may reduce the inflammatory response at postprandial state by decreasing intestinal LPS absorption.¹⁰

This study addressed the hypothesis that the long-term consumption of diets differing in the quantity and quality of fat for may influence postprandial intestinal bacterial endotoxin absorption, which may be partially responsible for the postprandial inflammatory response after the fat challenges. We aimed to assess the effect of the consumption of four diets, two high-fat diets (rich in either saturated or monounsaturated fat) and two low-fat diets (one of them supplemented with n-3 fatty acids), on plasma LPS levels (fasting and postprandial), wherein the composition of the postprandial challenge reflecting the fat composition of the diets in MetS patients.

MATERIALS AND METHODS

Population in Study and Recruitment. We performed this study within the framework of the LIPGENE study (Diet, genomics, and metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social, and economic analysis; NCT00429195), a Framework 6 Integrated Project funded by the European Union. A total of 75 MetS patients concluded the dietary intervention and participated in the post-intervention studies,¹⁶ in the Lipid and Atherosclerosis Unit at the Reina Sofia University Hospital, from February 2005 to April 2006.¹⁷ All participants gave their written informed consent and underwent a comprehensive medical history, physical examination, and clinical chemical analysis before enrolment. The local ethics committee approved the experimental protocol, which follows the Helsinki Declaration.

Study Design. The study design has been previously described. Briefly, the MetS patients, accordingly defined by the published criteria,¹⁸ were randomized to receive 1 of 4 different diets for 12 weeks. The LIPGENE study design, inclusion and exclusion criteria, and intervention protocol have been previously described.¹⁹ We administered a fat challenge (0.7 g/kg body weight reflecting the fatty acid composition of the diet consumed during the dietary intervention). We assessed the dietary intake and compliance by weighed food intake assessments 3 days in a week (2 weekdays and 1 weekend day) at the beginning of the study and after 6 and 12 weeks. We used DietSource version 2.0 for dietary analysis.

Dietary Intervention. We administered four isoenergetic diets whose compositions have been previously published¹⁷ (Supplemental Table 1). Briefly, two of the administered diets provided 38% energy (E) from fat: a diet rich in saturated fatty acids (HSFA) (38% E: 16% SFA, 12% MUFA, 6% PUFA) and a diet rich in monounsaturated fatty acids (HMUFA) (38% E: 8% SFA, 20% MUFA, 6% PUFA). The low-fat high-complex carbohydrate diets provided 28% of E as fat: (8% SFA, 11% MUFA, 6% PUFA). One of them (LFHCC n-3) was supplemented with 1.24 g/d supplement of long chain (n-3) PUFA

[ratio of 1.4:1 of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA)]. The LFHCC provided 1.2 g/d supplement of high-oleic sunflower seed oil capsules as placebo.

In the postintervention period (week 12), we administered a fat challenge reflecting the fatty acid composition of the previous diet (0.7 g/kg body weight; fat content, 65% of E; protein content, 10%; carbohydrates content, 25%).

The patients went to the hospital Reina Sofia at 8:00 a.m after a 12 h fast, having refrained from smoking during the fasting period and abstained from alcohol intake during the preceding 7 days. We collected fasting blood and adipose tissue samples before ingestion the meal, which takes place under supervision in less than 20 min. Subsequent blood and adipose tissue samples were taken at 4 h. The fatty meals provided an equal amount of fat ((0.7 g/kg body weight), cholesterol (5 mg/kg of body weight), and vitamin A (62.9 μ mol vitamin A (retinol)/m² body surface area), and provided a fat content 65% of E, a protein content of 10%, and a carbohydrates content of 25%. The subjects rested and did not consume any other food for 9 h but were allowed to drink water during the postprandial assessment. The composition of the meals was as follows: HSFA meal (21% MUFA, 38% SFA, 6% PUFA), based on butter, whole milk, white bread, and egg; HMUFA meal (43% MUFA, 12% SFA, 10% PUFA), based on olive oil, white bread, skim milk, eggs, yolk eggs, and tomato; LFHCC meal with placebo (28% MUFA, 21% SFA, 16% PUFA); and LFHCC n-3 breakfast with 1.24 g of LC n-3 PUFA (28% MUFA, 21% SFA, 16% PUFA). The meals after LFHCC diets were based on butter, white bread, olive oil, skim milk, eggs, egg yolks, and walnuts.

Monitoring for Adverse Effects. Clinical investigators assessed volunteer's adverse event each 2 weeks by using physical examinations, administering a checklist with diet-related symptoms and giving advice on how to remedy them.

Gene Expression Analysis by qRT-PCR. The gene expression in the PBMC and adipose tissue of inflammatory molecules has been described in detail previously.^{17,20–23} PBMC were separated from whole blood samples by a Ficoll gradient by centrifugation at 800g for 25 min at 20 °C, previous dilution 1:1 in PBS. The RNA was isolated with Tri Reagent (Sigma-Aldrich). We collected from the superficial abdominal the subcutaneous adipose tissue, lateral to the navel with a Bard Magnum (ref MG1522) instrument, using Bard Magnum Core (ref MN1410) needles homogenized by Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik). RNA from adipose tissue samples was isolated with a RiboPure kit (Ambion) commercial kit. Gene expression was determined by the OpenArray NT Cyclor platform (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), following the instructions of the manufacturer. We performed the RT-reaction with the commercial kit MessageBOOSTER cDNA Synthesis Kit for qPCR (Epicenter, Madison, WI), for adipose tissue RNA. Assays were selected from the database TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). The OpenArray Real-Time qPCR Analysis Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) was used to analyze the data.

For this study, we focused on PBMC mRNA levels of NFkB (Nuclear factor Kappa B), IKBa (Factor Kappa B inhibitor), MIF1 (Migration inhibitory factor macrophage), and adipose tissue: NRF2 (Nuclear Factor erythrocytes derived from type 2), XBP1 (X box binding protein), UCP2 (Uncoupling protein mitochondrial type 2), PPARg (Activated Receptor gamma peroxisome proliferator), ME2 (NAD dependent malic enzyme), CAV1 (Caveolin protein coding type 1), ADIR2 (adiponectin receptor 2) (Nuclear protein complex), PIK3CA (Protein coding phosphoinositide 3 kinase), APS (Antigen human prostate specific).

Determination of Plasma Lipids Parameters, LPS and LBP. Lipids parameters were determined as previously.²³ Endotoxin (LPS) was measured using the test Limulus Amebocyte Lysate (QCL-1000 Chromogenic LAL (Lonza Ibérica SA), according to the manufacturer's instructions.¹⁰ The LBP ELISA kit (HyCult Biotech, The Netherlands) was used to determine the LPS binding protein (LBP).

Statistical Analysis. The SPSS, version 18 program was used to perform the statistical analysis. All data presented are expressed as mean \pm SEM. The Kolmogorov–Smirnov test was used to test the normal distribution of variables to characterize the postprandial

Study of the Relationship between Plasma Levels of LPS and LBP with Inflammatory Markers in Plasma. In order to evaluate the relationship between plasma levels of LPS and LBP with the plasma levels of several adhesion molecules (sVCAM, sICAM, sP-selectin) and the pro-inflammatory cytokines (MCP1, TNF α , IL6), we performed Pearson's linear correlation between the plasma levels of these biomolecules and the plasma levels of LPS and LBP at fasting state and at postprandial state. We found a positive relationship between postprandial LPS levels and the soluble form of P-selectin ($R = 0.342$, $p = 0.004$).

Further, we analyzed the relationship between the postprandial increments of plasma LPS and LBP levels with the postprandial increments of adhesion molecules (and the pro-inflammatory cytokines) and we observed a positive relationship between postprandial LPS levels and the postprandial increment of sVCAM ($R = 0.282$, $p = 0.018$).

Study of the Relationship between Plasma Levels of LPS and LBP with Inflammatory Markers in Peripheral Mononuclear Cells. PBMCs can be a useful tool to determine the nature of the inflammatory response during the postprandial phase.⁷ Therefore, we used this cell population to investigate whether PBMC mRNA levels were different between diets. We observed a positive correlation between postprandial plasma levels of LPS and the postprandial expression of IkBa and MIF1 genes ($R = 0.326$, $p = 0.006$; and $R = 0.339$, $p = 0.004$, respectively). Likewise, we observed a negative relationship between postprandial LBP plasma levels and gene expression of NFkB p65 at the postprandial state ($R = -0.259$, $p = 0.033$) (Table 3 and Figure 2).

Table 3. Correlation Analysis between Plasma Levels of LPS with LBP and Inflammatory Markers in Peripheral Mononuclear Cells^a

		LPS	LBP
LPS	Coef. Pearson	n/a	-0.391
	p-value	n/a	0.001
LBP	Coef. Pearson	-0.391	n/a
	p-value	0.001	n/a
NFkB p65	Coef. Pearson	0.182	-0.259
	p-value	0.135	0.033
IKBA	Coef. Pearson	0.326	-0.038
	p-value	0.006	0.756
MIF1	Coef. Pearson	0.339	-0.250
	p-value	0.004	0.040

^aPearson's linear correlations between postprandial levels of LPS and LBP and the postprandial expression of inflammatory genes in peripheral mononuclear cells. LPS (lipopolysaccharide), LBP (lipopolysaccharide binding protein), NFkB p65 (p65 subunit of the nuclear factor Kappa B), IKBA (Factor Kappa B inhibitor, subunit a), and MIF1 (Migration inhibitory factor macrophage-1).

Moreover, we analyzed the relationship between the postprandial increments of plasma LPS and LBP levels with the postprandial increments of inflammatory markers in peripheral mononuclear cells, but we did not observe any statistically significant correlation.

Inter-Relationship between Plasma Levels of LPS and LBP with Inflammatory and Metabolism Markers in Adipose Tissue. Adipose tissue (AT) is a key organ initiating and propagating the chronic pro-inflammatory and metabolic phenotype characteristic of MetS. While profound modulation

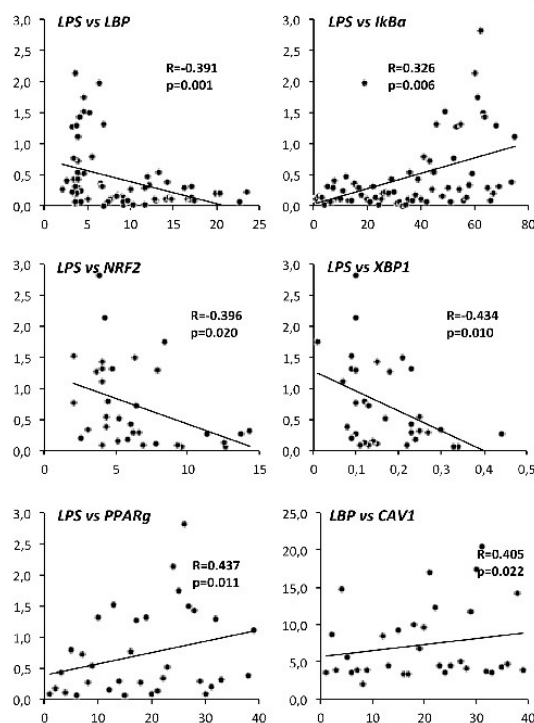


Figure 2. Relationship between plasma levels of LBP with LPS and gene expression in PBMC and adipose tissue. Pearson's linear correlations between postprandial levels of LPS and LBP and the postprandial expression in PBMC and adipose tissue.

of mRNA levels of a number of metabolic and inflammatory markers was not evident, several important inter-relationships between LPS and LBP and molecular markers of adipose metabolism and inflammation were observed. There was a negative correlation between LPS postprandial plasma levels and AT postprandial mRNA levels of NRF2 ($R = -0.396$, $p = 0.02$), XBP1 ($R = -0.434$, $p = 0.010$), UCP2 ($R = -0.445$, $p = 0.008$), and ME2 ($R = -0.402$, $p = 0.021$). Conversely LPS was positively correlated with PPARg postprandial mRNA levels ($R = 0.437$, $p = 0.011$). In addition, we observed a positive correlation between postprandial LBP plasma levels and adipose tissue postprandial mRNA levels of CAV1 ($R = 0.405$, $p = 0.022$), ADIR2 ($R = 0.567$, $p = 0.006$), PIK3CA ($R = 0.685$, $p = 0.001$), and APS ($R = 0.731$, $p = 0.007$) (Table 4 and Figure 2). These associations suggest that there may be some coregulation between plasma LPS and LBP with adipose biology.

In addition, we analyzed the relationship between the postprandial increments of plasma LPS and LBP levels with the postprandial increments molecular markers of adipose metabolism and inflammation. There was a positive correlation between the postprandial increment of LPS plasma levels and IL6 gene expression in adipose tissue ($R = 0.534$, $p = 0.007$). We also observed a negative correlation between the postprandial increment of LPS plasma levels and ADIPOQ ($R = -0.368$, $p = 0.038$), PLIN ($R = -0.375$, $p = 0.034$), and CANX ($R = -0.342$, $p = 0.048$). Moreover, there was a negative correlation between the postprandial increment of

Table 4. Correlation Analysis between Plasma Levels of LPS with LBP and Gene Expression in Adipose Tissue^a

		LPS	LBP
NRF2	Coef. Pearson	−0.396	−0.046
	p-value	0.020	0.798
XBP1	Coef. Pearson	−0.434	0.015
	p-value	0.010	0.932
UCP2	Coef. Pearson	−0.445	0.079
	p-value	0.008	0.662
PPAR γ	Coef. Pearson	−0.437	0.415
	p-value	0.011	0.018
ME2	Coef. Pearson	−0.402	0.209
	p-value	0.021	0.250
CAV1	Coef. Pearson	−0.234	0.405
	p-value	0.189	0.022
ADIR2	Coef. Pearson	−0.203	0.567
	p-value	0.377	0.006
PIK3CA	Coef. Pearson	−0.273	0.685
	p-value	0.272	0.001
APS	Coef. Pearson	−0.333	0.731
	p-value	0.316	0.007

^aPearson's linear correlations between postprandial levels of LPS and LBP and the postprandial expression of inflammation-, oxidative stress-, ER-stress, and metabolism-related genes in adipose tissue. LPS (lipopolysaccharide), LBP (lipopolysaccharide binding protein), Nr2 (Nuclear Factor erythrocytes derived from type 2), XBP1 (X box binding protein), UCP2 (Uncoupling protein mitochondrial type 2), PPAR γ (Activated Receptor gamma peroxisome proliferator), ME2 (NAD dependent malic enzyme), CAV1 (Caveolin protein coding type 1), ADIR2 (adiponectin receptor 2) (Nuclear protein complex), PIK3CA (Protein coding phosphoinositide 3 kinase), APS (Antigen human prostate specific).

LBP plasma levels and XBP1 ($R = -0.397$, $p = 0.022$), CARL ($R = -0.385$, $p = 0.027$), CANX ($R = -0.353$, $p = 0.044$), PDIA3 ($R = -0.391$, $p = 0.024$) (Table 5).

DISCUSSION

Our study showed a higher postprandial increase of plasma LPS concentrations after the consumption of the HSFA diet as compared with the HMFUFA and both LFHCC diets, whereas no differences in LBP plasma levels were observed. Moreover, we found a negative relationship between LPS and LBP plasma levels, which may be related to the dual role described for LBP. In fact, it has been proposed that LBP at low concentrations in plasma enhance the activation of PBMN by LPS, whereas high LBP plasma levels at consequence of acute-phase rise inhibits PBMN activation. Moreover, it has also been proposed that the binding of LPS to non membrane-associated LBP causes LPS neutralization and, therefore, the inhibition of PBMN activation.²⁵

On the other hand, the HSFA effect of LPS was only evident after a fat challenge, fasting levels were unchanged, which supports the idea of the usefulness of dynamic tests in assessing the nutritional health effects of a specific dietary intervention-based treatment in humans.^{26,27} Interestingly there were several positive relationships between postprandial LPS levels and the several inflammatory and metabolic genes in PBMN and adipose tissue. By contrast, we observed no differences in plasma levels of LBP after the consumption of any of the four diets studied. Our work suggests that postprandial investigations are critically insightful, in terms of understanding the inter-relationships between endotoxemia and metabolic health.

Table 5. Correlation Analysis between Postprandial Increase in Plasma Levels of LPS and LBP with Postprandial Increase of Gene Expression in Adipose Tissue^a

		LPS	LBP
ADIPOQ	Coef. Pearson	−0.368	−0.074
	p-value	0.038	0.694
PLIN	Coef. Pearson	−0.375	−0.077
	p-value	0.034	0.682
IL6	Coef. Pearson	0.534	−0.530
	p-value	0.040	0.051
XBP1	Coef. Pearson	−0.012	−0.397
	p-value	0.947	0.022
CARL	Coef. Pearson	−0.182	−0.385
	p-value	0.303	0.027
CANX	Coef. Pearson	−0.342	−0.353
	p-value	0.048	0.044
PDIA3	Coef. Pearson	0.098	−0.391
	p-value	0.580	0.024

^aPearson's linear correlations between postprandial increments of LPS and LBP and the postprandial increments of the expression of inflammation-, oxidative stress-, ER-stress and metabolism-related genes in adipose tissue. LPS (lipopolysaccharide), LBP (lipopolysaccharide binding protein), ADIPOQ (adiponectin), PLIN (perilipin), IL6 (interleukin 6), XBP1 (X-box binding protein 1), CARL (calreticulin), CANX (calnexin), and PDIA3 (protein disulfide isomerase family A, member 3).

The importance of postprandial metabolism in cardiovascular and metabolic diseases in human lies in the fact that this state is in continual flux every time we ingested foods.²⁸ In line with this, in humans, MetS has been shown to be a postprandial disease in which an exacerbated postprandial TG response occurs together with an alteration in the lipoprotein metabolism.³ Moreover, the postprandial inflammatory response has been related with postprandial hypertriglyceridemia, on the basis of the high expression of inflammatory markers in neutrophils and monocytes during the postprandial state in human.²⁹ In fact, the maximum TG levels are found between 3 and 4 h after the intake.³⁰ Taking that into account, we measured LPS plasma levels at 4 h after the meal intakes (postprandial measure). We also measured the LPS plasma levels at the fasting state and the difference calculated subtracting the plasma levels at fasting to the LPS plasma levels found at 4 h after meal intake allowed us to evaluate the postprandial changes in LPS levels.

Importantly, human and animal models studies have linked the postprandial inflammatory response with the intestinal absorption of endotoxins such as LPS.^{11,14} In fact, a transcellular mechanism involving LPS internalization by intestinal epithelial cell from the surface and the further transport of LPS to the Golgi has been proposed in a study in mice, in which LPS would be further incorporated to chylomicrons.³¹ It is important to note that within our study design, there was not observed any differences in the postprandial plasma TG response in these subjects in response to the different diets (as previously published),¹⁷ which may be ascribed to the fact that equal fat doses, albeit of different composition, were used. Nevertheless the differences found in the postprandial increments of plasma LPS levels after the intake of meals suggests that the intestinal absorption of endotoxins may be modulated by the composition of fat ingested. Our study showed that the consumption of the HSFA diet increased postprandial LPS levels but the HMFUFA or

LFHCC did not. Moreover, when intestinal permeability is altered, the defective tight junction barrier between intestinal cells allows the paracellular flux of LPS.³² Our results suggest that the consumption of an HSFA diet could increase the intestinal absorption of LPS, which can enter circulation by two nonexclusive mechanisms: (1) a paracellular transport through tight junction in the intestinal barrier and (2) a transcellular transport through lipid raft-mediated recruitment involving receptor-mediated endocytosis.³³ Although lung is also a source of LPS,³⁴ presumably this is not affected by dietary fat. In addition, taking into account that our experimental design included fasting and postprandial LPS measurements after a fatty meal, the differences observed between these two measurements are presumably due to diet-induced differences in intestinal absorption or clearance rates of LPS.

Second, as suggested from studies in animal models, the consumption of saturated fat may cause changes in the intestinal microbiota and lead to metabolic endotoxemia-induced inflammation.³⁵ In addition, the latter may also alter the intestinal barrier.³⁶ Therefore, the modification of the intestinal microbiota pattern after the long-term consumption of a specific diet may become apparent during the postprandial state, a condition affecting the endotoxemia, and therefore postprandial inflammation, as we have shown in a previous study in this same population. This study showed a higher postprandial inflammatory response after the consumption of an HSFA diet as compared with the other diets, with no differences in the postprandial lipemia between diets.¹⁷ These findings suggest that the postprandial increase in LPS levels after consumption of the HSFA diet may be responsible, at least partially, for the higher postprandial inflammatory response after the HSFA metabolic challenge. This idea is supported by the positive relationship found between the postprandial levels of LPS and the postprandial expression of I κ B α and MIF1 genes in PBMC. In fact, I κ B α acts as inhibitor of the key transcription factor NF κ B and is involved in the regulation of inflammation in order to act as a negative feedback to prevent inflammation from being perpetuated,³⁷ whereas the pro-inflammatory cytokine MIF1 acts as a macrophage migration inhibitory factor.³⁸ This suggests that the postprandial increase in LPS levels after the consumption of the HSFA diet, but not after the other diets, is involved in the higher postprandial inflammatory response observed after the consumption of the HSFA diet, as compared with the other diets. This fact is particularly important, as the postprandial increase in LPS levels may in the end be favoring the development of atherosclerosis, taking into account the deleterious effect of the higher postprandial inflammatory response observed after the consumption of the HSFA diet in the low-grade inflammation of metabolic syndrome patients,¹⁷ which has been shown to favor the development of atherosclerosis.⁶ This idea is supported by the positive correlation found between the postprandial levels of LPS and the postprandial levels of the adhesion molecule P-selectin³⁹ and the postprandial increment of LPS and sVCAM. Moreover, a higher postprandial inflammatory response after the consumption of an HSFA diet is also consistent with an increase in insulin resistance and a reduction insulin signaling, as previously shown for this population in a previous study.⁴⁰

AT is a key organ in obesity and MetS.⁴¹ The storing of excess of energy as fat in AT may trigger stress of the endoplasmic reticulum (ER) and activation of the unfolded protein response (UPR). This process is associated with an

alteration of the endocrine function of AT, together with the activation of the inflammatory signaling pathways and with an increased production of reactive oxygen species.⁴² In line with this, the relationships found between endotoxemia and the expression at the adipose tissue level of several inflammation- and metabolism-related genes support the idea that changes at intestinal levels such as intestinal permeability and changes in gut microbiota composition^{36,43} may trigger pathogenic mechanisms that promote the inflammation and insulin resistance associated with obesity and MetS in humans.^{44,45} In fact, a relationship between the plasma levels of the pro-inflammatory molecule LPS was observed with inflammation-related genes such as NRF2, a transcription factor which regulates the expression of many antioxidant genes⁴⁶ and XBP1 and CANX, an ER stress sensor and an UPR, respectively.⁴⁷ In addition, we observed the relationship between the plasma levels of LBP, an acute phase protein shown to responds to invasive bacterial infection in human,⁴⁸ with several protein involved in UPR in response to ER stress,^{42,47} metabolism-related genes such as PPAR γ , involved in adiposity,⁴⁹ the lipid storage-related gene CAV1,⁵⁰ and ADIR2 (adiponectin receptor),⁵¹ suggesting the interconnection between the intestine and the adipose tissue metabolism, presumably through changes in gut microbiota composition. In fact, human and animals studies have shown the consumption of high fat diet has been associated with reduction in *Bacteroidetes* and increase in *Firmicutes*, protein-rich and western diet with the *Bacteroides* enterotype whereas diet low in fat high in carbohydrates and fiber favors the prevalence of the *Prevotella* enterotype.³³ In addition, the relationship between gut microbiota and energy balance has already been described.⁵²

In conclusion, our results suggest that long-term dietary fat modification, followed by complementary fatty acid metabolic challenges may modulate postprandial activation in the inflammatory response. Wherein the consumption of a high-fat diet, enriched with saturated fat rather than monounsaturated fat or low-fat diets, may be due at least partially to increased postprandial endotoxemia after saturated fat consumption.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01909.

Composition of diets pre- and postintervention period, alongside dietary targets (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Phone: +34-957010947. Fax: +34-957218250. E-mail: jlopezmir@uco.es.

*E-mail: antonio.camargo@imibic.org

ORCID

Antonio Camargo: 0000-0002-0415-4184

Author Contributions

[†]J.L.-M. and A.C. equally contributed to this work.

Funding

This work was supported in part by Research Grants from the European Union [LIPGENE European Integrated Project-S05944]. It was also partly supported by research grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2009-122270 to

J.L.-M.); Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2012/39615, PIE14/00005, PIE 14/00031 to J.L.-M., AGL2015-67896-P to J.L.-M. and A.C., FIS PI10/01041 to P.P.-M., FIS PI13/00023 to J.D.-L.); Consejería de Salud, Junta de Andalucía (PI0193/09 to J.L.-M.), PI-0252/09 to J.D.-L., and PI-0058/10 to P.P.-M.; Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (CVI-7450 to J.L.-M.); Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Antonio Camargo is supported by an ISCIII research contract (Programa Miguel-Servet CP14/00114).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

REFERENCES

- (1) Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet* **2005**, *365* (9468), 1415–28.
- (2) Phillips, C.; Lopez-Miranda, J.; Perez-Jimenez, F.; McManus, R.; Roche, H. M. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Cardiol* **2006**, *21* (3), 185–93.
- (3) Khoury, D. E.; Hwalla, N.; Frochot, V.; Lacorte, J. M.; Chabert, M.; Kalopissis, A. D. Postprandial metabolic and hormonal responses of obese dyslipidemic subjects with metabolic syndrome to test meals, rich in carbohydrate, fat or protein. *Atherosclerosis* **2010**, *210* (1), 307–13.
- (4) Tushuizen, M. E.; Pouwels, P. J.; Bontemps, S.; Rustemeijer, C.; Matikainen, N.; Heine, R. J.; Taskinen, M. R.; Diamant, M. Postprandial lipid and apolipoprotein responses following three consecutive meals associate with liver fat content in type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* **2010**, *211* (1), 308–14.
- (5) Alcalá-Díaz, J. F.; Delgado-Lista, J.; Perez-Martínez, P.; García-Ríos, A.; Marín, C.; Quintana-Navarro, G. M.; Gómez-Luna, P.; Camargo, A.; Almaden, Y.; Caballero, J.; Tinahones, F. J.; Ordoñez, J. M.; Perez-Jimenez, F.; Lopez-Miranda, J. Hypertriglyceridemia influences the degree of postprandial lipemic response in patients with metabolic syndrome and coronary artery disease: from the CORDIOPREV study. *PLoS One* **2014**, *9* (5), e96297.
- (6) Subramanian, S.; Chait, A. The effect of dietary cholesterol on macrophage accumulation in adipose tissue: implications for systemic inflammation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **2009**, *20* (1), 39–44.
- (7) O'Grada, C. M.; Morine, M. J.; Morris, C.; Ryan, M.; Dillon, E. T.; Walsh, M.; Gibney, E. R.; Brennan, L.; Gibney, M. J.; Roche, H. M. PBMCs reflect the immune component of the WAT transcriptome—implications as biomarkers of metabolic health in the postprandial state. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58* (4), 808–20.
- (8) Jimenez-Gomez, Y.; Lopez-Miranda, J.; Blanco-Colio, L. M.; Marín, C.; Perez-Martínez, P.; Ruano, J.; Paniagua, J. A.; Rodriguez, F.; Egido, J.; Perez-Jimenez, F. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis* **2009**, *204* (2), e70–6.
- (9) Bellido, C.; Lopez-Miranda, J.; Blanco-Colio, L. M.; Perez-Martínez, P.; Muriana, F. J.; Martín-Ventura, J. L.; Marín, C.; Gomez, P.; Fuentes, F.; Egido, J.; Perez-Jimenez, F. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80* (6), 1487–1491.
- (10) Camargo, A.; Rangel-Zuniga, O. A.; Haro, C.; Meza-Miranda, E. R.; Pena-Orihuela, P.; Meneses, M. E.; Marín, C.; Yubero-Serrano, E. M.; Perez-Martínez, P.; Delgado-Lista, J.; Fernandez-Real, J. M.; Luque de Castro, M. D.; Tinahones, F. J.; Lopez-Miranda, J.; Perez-Jimenez, F. Olive oil phenolic compounds decrease the postprandial inflammatory response by reducing postprandial plasma lipopolysaccharide levels. *Food Chem.* **2014**, *162*, 161–71.
- (11) Cani, P. D.; Amar, J.; Iglesias, M. A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A. M.; Fava, F.; Tuohy, K. M.; Chabo, C.; Waget, A.; Delmee, E.; Cousin, B.; Sulpice, T.; Chamontin, B.; Ferrieres, J.; Tanti, J. F.; Gibson, G. R.; Casteilla, L.; Delzenne, N. M.; Alessi, M. C.; Burcelin, R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **2007**, *56* (7), 1761–72.
- (12) Milan, A. M.; Pundir, S.; Pileggi, C. A.; Markworth, J. F.; Lewandowski, P. A.; Cameron-Smith, D. Comparisons of the Postprandial Inflammatory and Endotoxaemic Responses to Mixed Meals in Young and Older Individuals: A Randomised Trial. *Nutrients* **2017**, *9* (4), 354.
- (13) Ahn, C. H.; Kim, E. K.; Min, S. H.; Oh, T. J.; Cho, Y. M. Effects of gemigliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on lipid metabolism and endotoxemia after a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obes. Metab.* **2017**, *19* (3), 457–462.
- (14) Ghanim, H.; Abuaysheh, S.; Sia, C. L.; Korzeniewski, K.; Chaudhuri, A.; Fernandez-Real, J. M.; Dandona, P. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care* **2009**, *32* (12), 2281–7.
- (15) Lyte, J. M.; Gabler, N. K.; Hollis, J. H. Postprandial serum endotoxin in healthy humans is modulated by dietary fat in a randomized, controlled, cross-over study. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15* (1), 186.
- (16) Tierney, A. C.; McMonagle, J.; Shaw, D. I.; Gulseth, H. L.; Helal, O.; Saris, W. H.; Paniagua, J. A.; Golabek-Leszczynska, I.; Defoort, C.; Williams, C. M.; Karlstrom, B.; Vessby, B.; Dembinska-Kiec, A.; Lopez-Miranda, J.; Blaak, E. E.; Drevon, C. A.; Gibney, M. J.; Lovegrove, J. A.; Roche, H. M. Effects of dietary fat modification on insulin sensitivity and on other risk factors of the metabolic syndrome—LIPGENE: a European randomized dietary intervention study. *Int. J. Obes.* **2011**, *35* (6), 800–9.
- (17) Cruz-Teno, C.; Perez-Martínez, P.; Delgado-Lista, J.; Yubero-Serrano, E. M.; García-Ríos, A.; Marín, C.; Gomez, P.; Jimenez-Gomez, Y.; Camargo, A.; Rodriguez-Cantalejo, F.; Malagon, M. M.; Perez-Jimenez, F.; Roche, H. M.; Lopez-Miranda, J. Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56* (6), 854–65.
- (18) Grundy, S. M.; Brewer, H. B., Jr.; Cleeman, J. I.; Smith, S. C., Jr.; Lenfant, C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler, Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24* (2), e13–8.
- (19) Shaw, D. I.; Tierney, A. C.; McCarthy, S.; Uprichard, J.; Vermunt, S.; Gulseth, H. L.; Drevon, C. A.; Blaak, E. E.; Saris, W. H.; Karlstrom, B.; Helal, O.; Defoort, C.; Gallego, R.; Lopez-Miranda, J.; Siedlecka, D.; Malczewska-Malec, M.; Roche, H. M.; Lovegrove, J. A. LIPGENE food-exchange model for alteration of dietary fat quantity and quality in free-living participants from eight European countries. *Br. J. Nutr.* **2009**, *101* (5), 750–9.
- (20) Camargo, A.; Meneses, M. E.; Perez-Martínez, P.; Delgado-Lista, J.; Jimenez-Gomez, Y.; Cruz-Teno, C.; Tinahones, F. J.; Paniagua, J. A.; Perez-Jimenez, F.; Roche, H. M.; Malagon, M. M.; Lopez-Miranda, J. Dietary fat differentially influences the lipids storage on the adipose tissue in metabolic syndrome patients. *Eur. J. Nutr.* **2014**, *53* (2), 617–26.
- (21) Camargo, A.; Meneses, M. E.; Perez-Martínez, P.; Delgado-Lista, J.; Rangel-Zuniga, O. A.; Marín, C.; Almaden, Y.; Yubero-Serrano, E. M.; Gonzalez-Guardia, L.; Fuentes, F.; Tinahones, F. J.; Roche, H. M.; Malagon, M. M.; Perez-Jimenez, F.; Lopez-Miranda, J. Dietary fat modifies lipid metabolism in the adipose tissue of metabolic syndrome patients. *Genes Nutr.* **2014**, *9* (4), 409.
- (22) Camargo, A.; Meneses, M. E.; Rangel-Zuniga, O. A.; Perez-Martínez, P.; Marín, C.; Delgado-Lista, J.; Paniagua, J. A.; Tinahones, F. J.; Roche, H.; Malagon, M. M.; Perez-Jimenez, F.; Lopez-Miranda, J.

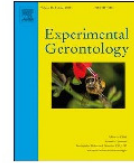
- Endoplasmic reticulum stress in adipose tissue determines postprandial lipoprotein metabolism in metabolic syndrome patients. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57* (12), 2166–76.
- (23) Meneses, M. E.; Camargo, A.; Perez-Martinez, P.; Delgado-Lista, J.; Cruz-Teno, C.; Jimenez-Gomez, Y.; Paniagua, J. A.; Gutierrez-Mariscal, F. M.; Tinahones, F. J.; Vidal-Puig, A.; Roche, H. M.; Perez-Jimenez, F.; Malagon, M. M.; Lopez-Miranda, J. Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome after the intake of different dietary models. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55* (12), 1759–70.
- (24) Gutierrez-Mariscal, F. M.; Perez-Martinez, P.; Delgado-Lista, J.; Yubero-Serrano, E. M.; Camargo, A.; Delgado-Casado, N.; Cruz-Teno, C.; Santos-Gonzalez, M.; Rodriguez-Cantalejo, F.; Castano, J. P.; Villalba-Montoro, J. M.; Fuentes, F.; Perez-Jimenez, F.; Lopez-Miranda, J. Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 induces postprandial changes in p53 in response to oxidative DNA damage in elderly subjects. *Age (Dordr)* **2012**, *34* (2), 389–403.
- (25) Gutschmann, T.; Muller, M.; Carroll, S. F.; MacKenzie, R. C.; Wiese, A.; Seydel, U. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infection and immunity* **2001**, *69* (11), 6942–50.
- (26) Stroeve, J. H.; van Wietmarschen, H.; Kremer, B. H.; van Ommen, B.; Wopereis, S. Phenotypic flexibility as a measure of health: the optimal nutritional stress response test. *Genes Nutr.* **2015**, *10* (3), 459.
- (27) van Ommen, B.; Keijer, J.; Heil, S. G.; Kaput, J. Challenging homeostasis to define biomarkers for nutrition related health. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53* (7), 795–804.
- (28) Parks, E. J. Recent findings in the study of postprandial lipemia. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2001**, *3* (6), 462–70.
- (29) van Oostrom, A. J.; Rabelink, T. J.; Verseyden, C.; Sijmonsma, T. P.; Plokker, H. W.; De Jaegere, P. P.; Cabezas, M. C. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis* **2004**, *177* (1), 175–82.
- (30) Kolovou, G. D.; Mikhailidis, D. P.; Kovar, J.; Lairon, D.; Nordestgaard, B. G.; Ooi, T. C.; Perez-Martinez, P.; Bilianou, H.; Anagnostopoulou, K.; Panotopoulos, G. Assessment and clinical relevance of non-fasting and postprandial triglycerides: an expert panel statement. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2011**, *9* (3), 258–270.
- (31) Ghoshal, S.; Witta, J.; Zhong, J.; de Villiers, W.; Eckhardt, E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J. Lipid Res.* **2009**, *50* (1), 90–7.
- (32) Andreasen, A. S.; Krabbe, K. S.; Krogh-Madsen, R.; Taudorf, S.; Pedersen, B. K.; Møller, K. Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15* (17), 1697–1705.
- (33) Moschen, A. R.; Wieser, V.; Tilg, H. Dietary Factors: Major Regulators of the Gut's Microbiota. *Gut Liver* **2012**, *6* (4), 411–6.
- (34) Uhlig, S.; Yang, Y.; Waade, J.; Wittenberg, C.; Babendreyer, A.; Kuebler, W. M. Differential regulation of lung endothelial permeability in vitro and in situ. *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *34* (1), 1–19.
- (35) Cani, P. D.; Bibiloni, R.; Knauf, C.; Waget, A.; Neyrinck, A. M.; Delzenne, N. M.; Burcelin, R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **2008**, *57* (6), 1470–81.
- (36) Cani, P. D.; Possemiers, S.; Van de Wiele, T.; Guiot, Y.; Everard, A.; Rottier, O.; Geurts, L.; Naslain, D.; Neyrinck, A.; Lambert, D. M.; Muccioli, G. G.; Delzenne, N. M. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* **2009**, *58* (8), 1091–103.
- (37) Lee, Y.; Allport, V.; Sykes, A.; Lindstrom, T.; Slater, D.; Bennett, P. The effects of labour and of interleukin 1 beta upon the expression of nuclear factor kappa B related proteins in human amnion. *Mol. Hum. Reprod.* **2003**, *9* (4), 213–218.
- (38) White, D. A.; Fang, L.; Chan, W.; Morand, E. F.; Kiriazis, H.; Duffy, S. J.; Taylor, A. J.; Dart, A. M.; Du, X. J.; Gao, X. M. Pro-inflammatory action of MIF in acute myocardial infarction via activation of peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* **2013**, *8* (10), e76206.
- (39) McEver, R. P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc. Res.* **2015**, *107* (3), 331–9.
- (40) Jimenez-Gomez, Y.; Cruz-Teno, C.; Rangel-Zuniga, O. A.; Peinado, J. R.; Perez-Martinez, P.; Delgado-Lista, J.; Garcia-Rios, A.; Camargo, A.; Vazquez-Martinez, R.; Ortega-Bellido, M.; Perez-Jimenez, F.; Roche, H. M.; Malagon, M. M.; Lopez-Miranda, J. Effect of dietary fat modification on subcutaneous white adipose tissue insulin sensitivity in patients with metabolic syndrome. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58* (11), 2177–88.
- (41) Kahn, B. B.; Flier, J. S. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106* (4), 473–81.
- (42) Zhang, K.; Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **2008**, *454* (7203), 455–62.
- (43) Frazier, T. H.; DiBaise, J. K.; McClain, C. J. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *J. Parenter. Enteral Nutr.* **2011**, *35* (5 Suppl.), 14S–20S.
- (44) Bajzer, M.; Seeley, R. J. Physiology: obesity and gut flora. *Nature* **2006**, *444* (7122), 1009–10.
- (45) Eizirik, D. L.; Cardozo, A. K.; Cnop, M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr. Rev.* **2008**, *29* (1), 42–61.
- (46) Kobayashi, M.; Yamamoto, M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid. Redox Signaling* **2005**, *7* (3–4), 385–94.
- (47) Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* **2010**, *140* (6), 900–17.
- (48) Ubenauf, K. M.; Krueger, M.; Henneke, P.; Berner, R. Lipopolysaccharide binding protein is a potential marker for invasive bacterial infections in children. *Pediatric infectious disease journal* **2007**, *26* (2), 159–62.
- (49) Kawai, M.; Rosen, C. J. PPARgamma: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2010**, *6* (11), 629–36.
- (50) Brasaemle, D. L.; Dolios, G.; Shapiro, L.; Wang, R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (45), 46835–42.
- (51) Yamauchi, T.; Kadowaki, T. Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell Metab.* **2013**, *17* (2), 185–96.
- (52) Bouter, K. E.; van Raalte, D. H.; Groen, A. K.; Nieuwdorp, M. Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 1671.

5. Endotoxemia is modulated by quantity and quality of dietary fat in older adults



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/expgero

Endotoxemia is modulated by quantity and quality of dietary fat in older adults

Javier Lopez-Moreno^{a,b}, Sonia Garcia-Carpintero^{a,b}, Francisco Gomez-Delgado^{a,b}, Rosa Jimenez-Lucena^{a,b}, Cristina Vals-Delgado^{a,b}, Juan F. Alcala-Diaz^{a,b}, Irene Roncero-Ramos^{a,b}, Oriol A. Rangel-Zuñiga^{a,b}, Elena M. Yubero-Serrano^{a,b}, Maria M. Malagon^{b,c}, Jose M. Ordovas^{d,e,f}, Pablo Perez-Martinez^{a,b}, Jose Lopez-Miranda^{a,b,*}, Antonio Camargo^{a,b,*}

^a Lipids and Atherosclerosis Unit, GC9 Nutrigenomics, Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Spain.

^b CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Cordoba, Spain.

^c Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, Córdoba, Spain.

^d Nutrition and Genomics Laboratory, J.M.-US Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, MA, United States.

^e IMDEA Alimentación, Madrid, Spain. CNIC, Madrid, Spain.

^f Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Aging
Atherosclerosis
Diet
Lipopolysaccharide
Inflammation

ABSTRACT

Background: Aging is an important determinant of the rate of atherosclerosis development, mainly through low-grade inflammation. Diet, and particularly its fat content, modulates the inflammatory response in fasting and postprandial states.

Objective: We aimed to study the effects of dietary fat on endotoxemia in healthy older adults.

Materials and methods: Twenty healthy older adults were randomized to three diets, lasting three-weeks each, using a crossover design: 1. A Mediterranean diet enriched in MUFA with virgin olive oil. 2. An SFA-rich diet. 3. A low-fat high-carbohydrate diet enriched in n-3 PUFA (α -linolenic acid of plant origin) (CHO-PUFA diet). At the end of each period, after a 12-h fast, the subjects received a meal with a composition similar to the dietary period just completed. We determined the fasting and the postprandial plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein (LBP).

Results: In the fasting state, we observed lower LPS plasma levels after the consumption of the CHO-PUFA diet ($P = 0.046$) in comparison with the consumption of the Med and SFA-rich diets. In the postprandial measurements, we observed a statistically significant increase in plasma levels of LPS ($P = 0.044$) and a decrease in LBP ($P = 0.003$) after the intake of the CHO-PUFA meal, whereas no postprandial changes were observed after the ingestion of the Med and SFA-rich meals.

Conclusion: Our results, together with those obtained in a previous study, support the concept that the consumption of the Med Diet, in contrast to a low-fat PUFA diet, constitutes a more suitable dietary lifestyle for preventing the development of atherosclerosis in a population at risk, such as older adults.

1. Introduction

The aging process in industrialized societies has been associated with atherosclerosis through multiple mechanisms, including chronic low-grade inflammation and increased oxidative stress (Bruunsgaard et al., 2001; Herrera et al., 2010). In fact, atherosclerosis can be considered an inflammatory disease, characterized by the accumulation of inflammatory cells in the vascular wall of the blood vessels (Kriszbacher

et al., 2005). Moreover, the relevance of chronic inflammation in the development of atherosclerosis has been observed in epidemiological studies, which have demonstrated an increase in cardiovascular risk in individuals with high levels of inflammation markers (Mahmoudi et al., 2007).

A combination of the above factors leads us to infer that inflammation and aging are intimately linked to the development of atherosclerosis. Thus, atherosclerosis in the elderly involves a series of

* Corresponding authors at: Lipids and Atherosclerosis Unit, IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba, Av. Menéndez Pidal, s/n., 14004 Córdoba, Spain.

E-mail addresses: jlopezmir@uco.es (J. Lopez-Miranda), antonio.camargo@imibic.org (A. Camargo).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.11.006>

Received 10 September 2017; Received in revised form 7 November 2017; Accepted 8 November 2017
0531-5565/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

highly specific cellular and molecular responses, which may be described, as a whole, as an age-related inflammatory disease (Bruunsgaard et al., 2001). In this low-grade inflammation state associated with age, the postprandial state represents a homeostasis challenge due to the increase in pro-inflammatory lipid particles, the rise in oxidative stress and the transient increase in pro-inflammatory molecules released by human white blood cells and endothelial cells (Chung et al., 2006; Parks, 2001).

Diet, mainly dietary fat, may modulate the postprandial inflammatory response. We have previously shown that the consumption of a Mediterranean (Med) diet reduces the postprandial inflammatory response as compared with a saturated fatty acid (SFA)-rich diet, with the low-fat high-carbohydrate diet enriched in n-3 PUFA (CHO-PUFA) diet having an intermediate effect compared with the other diets (Camargo et al., 2012). Another study in metabolic syndrome patients showed a higher postprandial inflammatory response after the consumption of a diet rich in saturated fat compared to a diet rich in monounsaturated fat, whereas low-fat diets (supplemented or not with n-3 PUFA) had an intermediate effect compared with the high monounsaturated fat and high saturated fat diets (Cruz-Teno et al., 2012).

Intestinal fat absorption promotes the absorption of endotoxins, such as the highly pro-inflammatory lipopolysaccharides (LPS), which may be partially responsible for, or may enhance, the postprandial inflammatory response (Cani et al., 2007). It has been shown that low-fat meals induce reduced postprandial LPS levels when compared with high-fat meals (Ghanim et al., 2009). Also, we have demonstrated that the phenolic compounds found in virgin olive oil may reduce the postprandial inflammatory response by decreasing intestinal LPS absorption (Camargo et al., 2014). Moreover, it has been proposed that there is a host-microbiome interaction that mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia (Kaliannan et al., 2015).

We also hypothesized that the quantity and quality of fat might determine LPS intestinal absorption in older adults, which, in turn, may influence the postprandial inflammatory response, taking into account the pro-inflammatory properties associated with LPS. We, therefore, aimed to evaluate the effect of the consumption of three diets with different quality and quantities of fat on fasting and postprandial plasma LPS in older adults, with a postprandial challenge whose contents reflected the fatty acid composition of the dietary intervention.

2. Materials and methods

2.1. Subjects and diets

The study was performed on 20 independently-living elderly subjects (10 men and 10 women). Recruitment of the participants for the dietary intervention took place between January 1st, 2006 and 2007. Informed consent was obtained from all the participants, and all underwent a comprehensive medical history, physical examination and health assessment chemical tests before enrollment. None of the subjects showed evidence of hepatic, renal, thyroid or cardiac dysfunction and they were requested to maintain their habitual physical activity and lifestyle and asked to record in a diary any event that could affect the outcome of the study, such as stress, a change in smoking habits or alcohol consumption, or the intake of foods not included in the experimental design. Six of the participants had high blood pressure, two had hyperlipidemia and three participants had diabetes mellitus. None of the participants showed evidence of high alcohol consumption or a family history of an early-onset cardiovascular disease. None of the participants were active smokers. This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all the procedures involving human subjects/patients were approved by the Human Investigation Review Committee at Reina Sofia University Hospital (Cordoba, Spain).

The participants were randomly assigned to receive, in a crossover

design, three diets each for four weeks: 1) A Mediterranean diet enriched in monounsaturated fatty acid (MUFA) with virgin olive oil, containing 15% of energy as protein, 47% as carbohydrate and 38% as fat (24% MUFA), < 10% SFA (saturated fatty acids) and 4% polyunsaturated fatty acid (PUFA), of which 0.4% was α -linolenic (ALA); 2) An SFA-rich diet, with 15% of energy as protein, 47% as carbohydrate and 38% as fat (12% MUFA, 22% SFA, 4% PUFA with 0.4% ALA), and 3) A low-fat, high-carbohydrate diet enriched in n-3 PUFA (CHO-PUFA diet), with 15% of energy as protein, 55% as carbohydrate and 30% as fat (10% SFA, 12% MUFA and 8% PUFA with 2% ALA). The cholesterol intake was constant (< 300 mg/d) throughout the three periods. The n-3 PUFA enrichment of the high-CHO and low-fat diet was achieved via the use of natural food components rich in α -linolenic acid of plant origin (mainly walnuts (*Juglans regia* L.)). The carbohydrate intake from the CHO-PUFA diet was based on the consumption of biscuits, jam and bread. Eighty percent of the MUFA from the Med Diet was provided by virgin olive oil, which was used for cooking, salad dressing and as a spread. Butter was used as the main source of SFAs in the SFA-rich diet.

At the end of each dietary intervention period and after a 12-h fast, the subjects were given a fatty meal consisting of a breakfast containing similar food to that consumed in each of the diets, and corresponding to 50–60% of the subject's daily normal calorie intake. The methodology of the fatty meal test has been validated and extensively used by our group (Jimenez-Gomez et al., 2009; Jimenez-Gomez et al., 2010), and is described below. The composition of the experimental diets was calculated using the US Department of Agriculture (Service, 1987) G. V. food tables and the Spanish food-composition tables for local foodstuffs (Varela, 1980).

Before starting the intervention period, the volunteers completed a 3-d weighed food diary and an extensive food frequency questionnaire (FFQ) (Martinez-Gonzalez et al., 2004), which allowed the dietary changes to be identified. The meals were administered in the intervention study by dietitians. At the start of the intervention period, each patient was provided with a handbook for the diet to which they had been randomly assigned, which included 14 menus including normal, solid foods. Advice was given on foods to choose and those to avoid when eating out. At baseline, the volunteers were provided with a supply of food included in the study calculated to last two weeks and a pack of additional food every fortnight or when required. At these points, the patients were required to complete a 24-h recall of the previous day's food intake and a short food-use questionnaire based on the study foods, to monitor and motivate the volunteers to keep following the dietary advice. A score was used to assess the number of changes to their diet achieved in the 24-h recall and additional advice was given if either the 24-h recall or FFQ showed an insufficient number of dietary changes. The volunteers were asked to complete 3-d weighed food diaries at baseline, week 2 and week 4. The weighed food intake over two weekdays and one weekend day was obtained by using scales provided by the researchers. A dietary analysis software program (DietSource version 2.0) was used in the nutritional evaluation of the menus. The staff at the biochemical laboratory was unaware of the diet that each participant was following when taking the measurements.

2.2. Sample collection

Venous blood samples were obtained at the end of each dietary intervention period in the fasting state, after a 12-h fast, before having breakfast and at 1, 2 and 4 h after breakfast. Samples from the fasting and postprandial states were collected in tubes containing 1 g EDTA/L and were stored in containers with iced water and kept in the dark. Special care was taken to avoid exposure to air, light and ambient temperature. The plasma was separated from the rest of the blood by low-speed centrifugation at 1500 x g for 15 min at 4 °C within 1 h of extraction.

2.3. Measurement of plasma lipid parameters, LPS and LBP

Lipid parameters were determined as previously (Meneses et al., 2011). LPS endotoxin was measured using the Limulus Amebocyte Lysate test (QCL-1000 Chromogenic LAL (Lonza Ibérica SA)), following the manufacturers' instructions (Camargo et al., 2014). LPS binding protein (LBP) was measured using the human LBP ELISA kit (HyCult Biotech, Netherlands), again following the manufacturers' instructions.

2.4. Statistical analysis

The SPSS statistical software, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for the statistical comparisons. The Kolmogorov-Smirnov test was used to check the normality of the distribution of variance values. When the data did not show the normality of the distribution, we log transformed them to obtain a normal distribution. To evaluate the data variation, an analysis of variance for repeated measures (ANOVA) was performed, followed by the Bonferroni correction for multiple comparisons. The contrast statistic used was the sphericity assumption, and when this was not satisfied, the Greenhouse-Geisser correction was used. Post hoc statistical analysis was done to identify significant differences between the dietary treatments. A probability of below 0.05 was considered significant. A study of the relationship between parameters was carried out using Pearson's linear correlation coefficient. A probability of < 0.05 was considered significant. All the data presented in the text and tables are expressed as a mean \pm S.E.M.

3. Results

3.1. Baseline characteristics of the participants

The baseline characteristics of the 20 healthy participants who completed the three dietary intervention periods are shown in Table 1. Briefly, the subjects (10 men and 10 women) had an average age of 67.1 ± 4.52 and an average body mass index (BMI) of 31.9 ± 5.50 .

3.2. Dietary fat quality and quantity and fasting endotoxemia

To investigate the influence of dietary fat quality and quantity on fasting endotoxemia, we measured the LPS and LBP plasma levels in the fasting state after the consumption of the three different diets administered in our study. We observed lower LPS plasma levels after the consumption of CHO-PUFA diet ($P = 0.046$), as compared with the consumption of Med and SFA-rich diets. In contrast, no differences in LBP plasma levels were observed (Table 2).

Table 1

Baseline characteristics of the participants in the study. All values are means \pm DS. BMI, Body mass index; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein. * p Independent-samples t -test between men and women.

	Global (n = 20)	Men (n = 10)	Woman (n = 10)	P-value
Age (y)	67.1 \pm 4.52	65.8 \pm 3.39	68.4 \pm 5.29	0.208
Weight (kg)	83.1 \pm 17.07	87.7 \pm 18.32	78.4 \pm 15.22	0.232
Height (cm)	160.7 \pm 8.12	166.6 \pm 5.56	154.8 \pm 5.54	< 0.001
BMI (kg/m ²)	31.9 \pm 5.50	31.2 \pm 6.00	32.5 \pm 5.19	0.614
Waist circumference (cm)	100.9 \pm 12.88	109.6 \pm 11.61	92.4 \pm 7.07	0.001
Blood pressure (mm Hg)	107.3 \pm 14.54	106.6 \pm 9.28	108.1 \pm 18.95	0.836
Total Cholesterol (mmol/L)	4.69 \pm 0.57	4.88 \pm 0.63	4.50 \pm 0.45	0.141
Triglycerides (mmol/L)	1.02 \pm 0.38	1.21 \pm 0.37	0.83 \pm 0.27	0.013
HDL-C (mmol/L)	1.34 \pm 0.24	1.26 \pm 0.19	1.42 \pm 0.27	0.137
LDL-C (mmol/L)	2.88 \pm 0.49	3.06 \pm 0.50	2.70 \pm 0.43	0.107
Apolipoprotein B (g/L)	0.83 \pm 0.14	0.90 \pm 0.16	0.76 \pm 0.08	0.036
Apolipoprotein A-I (g/L)	1.47 \pm 0.17	1.43 \pm 0.12	1.52 \pm 0.21	0.301
Glucose (mmol/L)	5.40 \pm 0.82	5.77 \pm 0.93	5.07 \pm 0.56	0.064
Insulin (pmol/L)	67.73 \pm 28.91	80 \pm 34.79	56.68 \pm 17.65	0.078

Table 2

Fasting levels of LPS and LBP after the dietary intervention. Mean (\pm S.E.M.) of LPS (EU/ml) and LBP (μ g/ml) plasma levels at 12-h fasting. Differences between diet were assessed by One-ANOVA statistical analysis. Med, Mediterranean diet; SFA, saturated fatty acid-rich diet; CHO-PUFA, low-fat high-complex carbohydrate diet supplemented with n-3 PUFA.

Diet	Med	SFA	CHO-PUFA	P-value
LPS (EU/ml)	0.38 \pm 0.06	0.35 \pm 0.03	0.24 \pm 0.01	0.046
LBP (μ g/ml)	14.7 \pm 1.08	15.6 \pm 1.20	16.0 \pm 1.01	0.461

3.3. Postprandial endotoxemia in the fat challenge

To assess the effects of different types of fat in the diet on postprandial endotoxemia, after each dietary period we administered a fat challenge reflecting the fatty acid composition of the diet consumed. We observed a trend for a postprandial increase of LPS levels after the intake of the CHO-PUFA meal ($P = 0.055$). However, when we normalized postprandial values according to the differences found in the fasting state by fold change calculation (postprandial values divided by fasting values), we observed a statistically significant increase in LPS plasma levels after the intake of the CHO-PUFA meal ($P = 0.001$), whereas no postprandial changes were observed after the ingestion of the Med and SFA-rich meals (Fig. 1).

Moreover, we observed a decrease in the LBP plasma levels after the intake of the CHO-PUFA meal ($P = 0.002$), whereas no postprandial changes were observed after the ingestion of the Med and SFA-rich meals (Fig. 2).

3.4. Study of the relationship between levels of LPS and LBP with inflammatory markers

Next, we evaluated the relationship between endotoxemia and inflammatory markers in the plasma and PBMC, a subset of white blood cells that can be useful in determining the nature of the inflammatory response (O'Grada et al., 2014). We observed a positive relationship between fasting LPS plasma levels and IkB gene expression in PBMC ($R = 0.274$, $P = 0.034$). Moreover, we also observed a positive correlation between postprandial LPS plasma levels and MCP-1 gene expression in PBMC ($R = 0.377$, $P = 0.003$). Besides, we found a positive relationship between fasting LBP plasma levels and fasting plasma levels of MCP1 ($R = 0.255$, $P = 0.049$), and TNF ($R = 0.419$, $P = 0.001$) (Fig. 3).

4. Discussion

Our study showed that the consumption of the CHO-PUFA diet

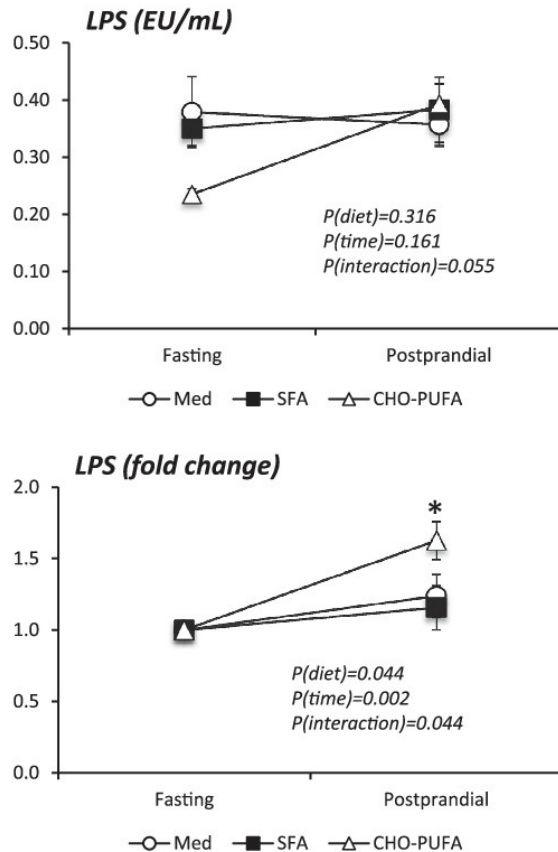


Fig. 1. Postprandial increase in LPS levels. Mean (\pm S.E.M.) of LPS (EU/mL) between the plasma levels after each diet, at 12-h fasting and post-intervention and 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each diet. We normalized postprandial values according to the differences found in the fasting state by fold change calculation (postprandial values divided by fasting values). Med, Mediterranean diet; SFA, saturated fatty acid-rich diet; CHO-PUFA, low-fat high-complex carbohydrate diet supplemented with n-3 PUFA. ANOVA for repeated measures, global p -values: P diet: diet effect; P time: time effect; P interaction: diet by time interaction. * $p < 0.05$ for postprandial fold change in the Post Hoc Bonferroni multiple comparison tests.

reduced the LPS fasting plasma levels when compared with the Med and SFA-rich diets. Moreover, the ingestion of the CHO-PUFA meal increased LPS levels compared with the fasting state, although no differences in the absolute postprandial LPS plasma levels were observed between the diets. In contrast, postprandial LBP plasma levels were lower after the ingestion of the CHO-PUFA meal, whereas no differences were observed in the fasting state after the dietary period.

Our intestines harbor a vast microbial community (Neish, 2009), which acts collectively as an organ that is fully integrated into the host metabolism. It is involved in the energy extraction from nutrients, regulates innate and adaptive immunity and plays a role in energy balance (Tremaroli and Backhed, 2012). It has been shown that the gut lumen contains over 1 g of LPS, a component of the Gram (–) bacterial cell wall (Berg, 1996). LPS can enter the systemic circulation via two major routes: the paracellular route, through tight junctions between intestinal epithelial cells (IEC) (Hietbrink et al., 2009), and the transcellular route, through epithelial cells (Neal et al., 2006) as a result of the raft recruitment of LPS-related signaling proteins leading to signaling and endocytosis (Triantafilou et al., 2002). In addition, a

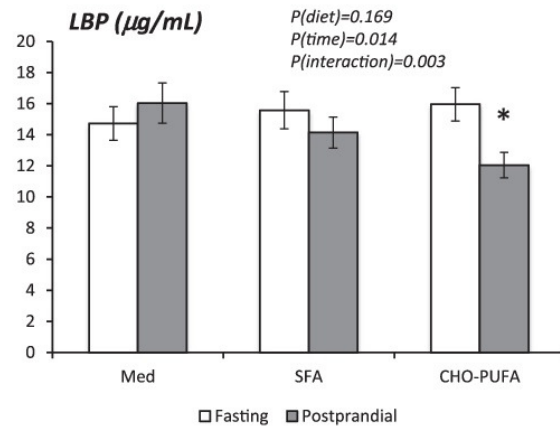


Fig. 2. Postprandial changes in LBP levels. Mean (\pm S.E.M.) of LBP (mg/mL) differences between the plasma levels after each diet, at 12-h fasting and post-intervention and 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each diet. Med, Mediterranean diet; SFA, saturated fatty acid-rich diet; CHO-PUFA, low-fat high-complex carbohydrate diet supplemented with n-3 PUFA. ANOVA for repeated measures, global p -values: P diet: diet effect; P time: time effect; P interaction: diet by time interaction. * $p < 0.05$ between fasting and postprandial in the Post Hoc Bonferroni multiple comparison tests.

transcellular mechanism has been proposed, involving LPS internalization by IEC through the apical surface and LPS transport to the Golgi apparatus, to be further incorporated into chylomicrons (Ghoshal et al., 2009).

Our results show the consumption of a CHO-PUFA is associated with lower fasting LPS plasma levels. Considering that in the fasting state there is no chylomicron formation, this suggests that the changes are due to decreased paracellular absorption. This interpretation is consistent with previous studies showing a link between the consumption of a high-fat diet and endotoxemia (Neves et al., 2013; Pendyala et al., 2012). In fact, our study showed higher fasting endotoxemia after the consumption of Med and SFA-rich diets with a higher fat content than the CHO-PUFA diet (38% of energy as fat in Med and SFA-rich diet versus 30% of energy as fat in CHO-PUFA diet).

In contrast, no differences in the LPS postprandial levels were found between the diets. However, when we compared the postprandial levels after the meal ingestion versus fasting levels, we observed that the CHO-PUFA meal intake increased the LPS levels, whereas no significant changes were observed after the consumption of the Med and SFA-rich meals. Considering that chylomicron formation is induced after food ingestion, the differences found in the postprandial increase in LPS may be related with postprandial lipemia. However, no differences in TAG postprandial levels were found between diets, and therefore the transcellular route for LPS absorption must be ruled out as the cause of the differences found in the postprandial increase of LPS. Therefore, it may be the type of fat, which determines the differences in how LPS is absorbed into the chylomicrons. In fact, a previous study in an animal model showed that the type of fat might differentially modulate intestinal endotoxin transport and circulating concentrations (Mani et al., 2013). In our study, we administered 3 diets, which differed not only in the type of fat but also in the quantity, the fat content of the CHO-PUFA diet being lower. However, in the postprandial study performed after each dietary intervention, we administered a meal, which contained the similar amounts of fat reflecting the fatty acid composition of the ongoing dietary phase. Taking all this into account, the PUFA (CHO-PUFA meal) may somehow favor the absorption of LPS into the chylomicrons, and therefore be responsible for the rise in LPS observed after the intake of the CHO-PUFA meal, when compared with the Med and SFA-rich meals.

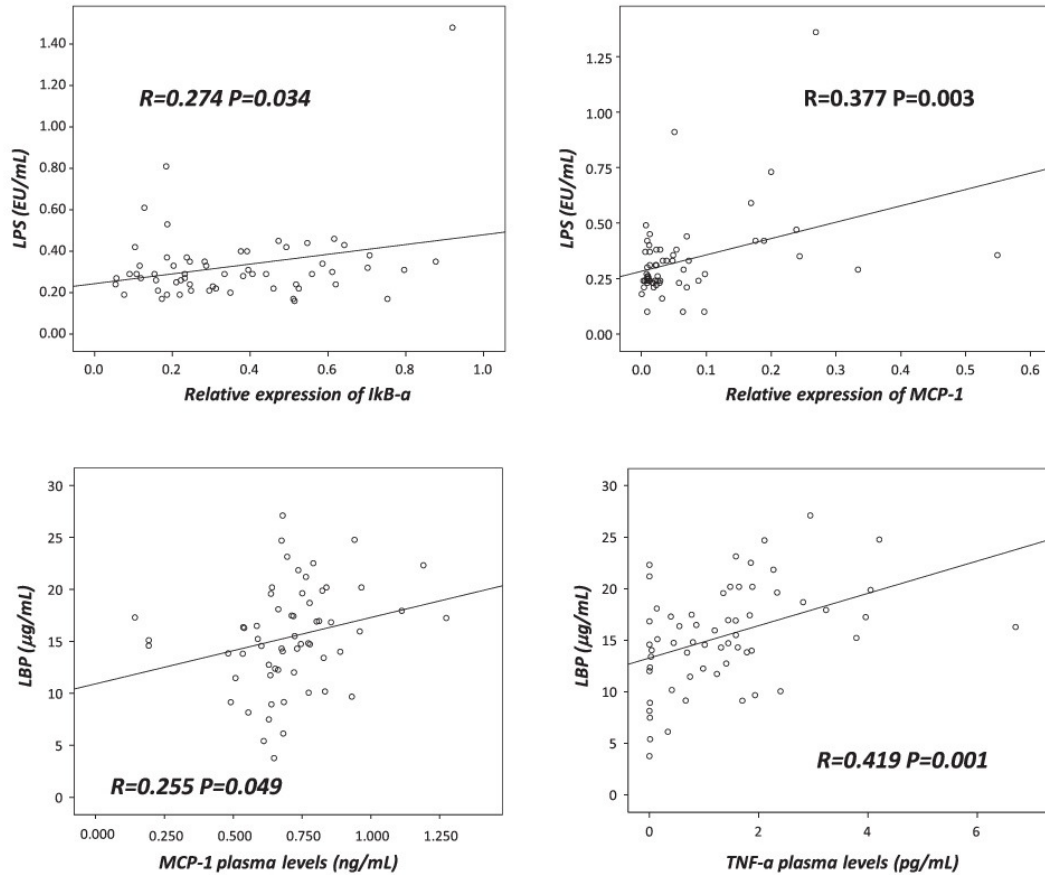


Fig. 3. Relationship between endotoxemia and inflammatory markers. Pearson's linear correlations between postprandial levels of LPS and LBP and the postprandial expression in PBMC and plasma biomarker levels.

Interestingly, this rise in LPS after the CHO-PUFA meal intake was accompanied by a decrease in LBP plasma levels. Initially, low levels of LBP were thought to potentiate cell responses to LPS, whereas high LBP concentrations were inhibitory (Gutsmann et al., 2001). Further studies have shown that high LBP levels appear to be associated with an increased risk of bacterial infection and immune and hemodynamic derangement, rather than the suppression of these responses (Minter et al., 2009). The latter theory is also supported by our study, based on the positive relationship found with the pro-inflammatory plasma biomarkers.

We have previously shown, in this same population, that the consumption of a Med diet reduces the postprandial inflammatory response, compared with a SFA-rich diet, with an intermediate response of the CHO-PUFA diet (Camargo et al., 2012). The postprandial inflammatory response observed after food intake is closely associated with the postprandial increase of TAG in plasma (van Oostrom et al., 2004). In our study, no relevant differences in postprandial TAG levels were found between the diets, and therefore it may be an alternative non-exclusive mechanism, which is affecting postprandial inflammatory response.

The current work may explain, at least partially, why the CHO-PUFA diet did not produce a similar effect to that of the Med diet in terms of postprandial inflammatory response in our previous study (Camargo et al., 2012), despite the fact that PUFA is considered a healthy fat. In fact, many studies have shown that saturated fat is pro-

inflammatory, compared with monounsaturated and polyunsaturated fat (Lopez-Miranda et al., 2007). In fact, a dose-dependent effect in reducing inflammation in response to endotoxemia has been described for n-3 PUFA (Ferguson et al., 2014). However, this effect of PUFA on endotoxemia has been shown to be rather complex, and the n-6/n-3 ratio may drive the observed effects (Kaliannan et al., 2015).

We previously showed that both CHO-PUFA and Med diets produced lower postprandial inflammatory responses than the SFA-rich diet (Camargo et al., 2012). However, the postprandial intestinal absorption of LPS after the CHO-PUFA meal seems to slightly increase the postprandial inflammatory response compared with the Med diet. Thus, the reduction in the inflammatory response by n-3 PUFA is counteracted by pro-inflammatory LPS postprandial absorption after the CHO-PUFA meal, resulting in a slight postprandial inflammatory response, which is higher than the response in the Med but lower than with the SFA-rich diet, as previously reported (Camargo et al., 2012).

Inflammation is the main underlying physio-pathological mechanism of atherosclerosis (Momiya et al., 2014), and involves a series of highly specific cellular and molecular responses which may be described, as a whole, as an age-related inflammatory disease (Ross, 1999). An increase in chronic low-grade inflammation is associated with aging, and this links aging to the development of atherosclerosis (Bruunsgaard et al., 2001; Herrera et al., 2010). Previously, we have observed that the consumption of a Med diet reduces the postprandial inflammatory response compared with an SFA-rich diet, while the

consumption of a CHO-PUFA diet has an intermediate effect (Camargo et al., 2012). On the basis of the postprandial increase in LPS after a CHO-PUFA meal, the current work explains why a low-fat diet supplemented with n-3 PUFA was less effective than the Med diet in reducing the postprandial inflammatory response. Taken together, our findings suggest that long-term dietary modification may help to prevent age-related inflammatory disease and may explain the lower cardiovascular risk found in populations with a high adherence to the Med Diet (Sanchez-Tainta et al., 2008).

Our study has limitations. One limitation lies in the reduced sample size, but it has the advantage of a randomized crossover design in which all the participants have experienced the three dietary periods, each acting as his/her control and strengthening the fact that the effects observed are due to the influence of the type of diet. Another limitation is ensuring adherence to dietary instructions, which is difficult in a feeding trial. However, in our study, adherence to the recommended dietary patterns was satisfactory, as judged by the measurements of compliance.

In conclusion, our results support the idea that the consumption of the Med Diet, in contrast to a low-fat PUFA diet, is a more suitable lifestyle option to help prevent the development of atherosclerosis in a population at risk such as older adults.

Authors' contributions

The author's responsibilities were as follows: Ja L-M and J L-M and A C conceived and designed the experiments; Ja L-M, S G-C, F G-D, R J-L, C V-D, JF A-D and I R-R participated in the recruitment and carried out the clinical and nutritional control of the volunteers; Ja L-M, S G-C, F G-D, R J-L, C V-D, JF A-D and I R-R, performed the experiments and collected the data; JF A-D, I R-R, OARZ, EMY-S and A C analyzed and interpreted the data; Ja L-M and A C drafted the manuscript; M M-M, JMO, P P-M and A C provided critical revision of the papers for important intellectual content; J L-M and A C had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors were involved in writing the paper and gave their final approval to the submitted and published versions.

Conflict of interest statement

None of the authors has any conflict of interest that could affect the performance of this work or the interpretation of the data.

Acknowledgements

The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. The CORDIOPREV study is supported by the Fundación Patrimonio Comunal Olivarero, Junta de Andalucía (Consejería de Salud, Consejería de Agricultura y Pesca, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa), Diputaciones de Jaén y Córdoba, Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud and Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, Gobierno de España; Ministerio de Economía y Competitividad [AGL2012/39615, PIE14/00005, and PIE 14/00031 to J L-M; AGL2015-67896-P to J L-M and A C; CP14/00114 to A C; FIS PI13/00023 to J D-L, PI13/00619 to F P-J; BFU2016-76711-R to MMM]; Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Proyectos de Investigación de Excelencia, Junta de Andalucía [CVI-7450 to J L-M]; and by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Antonio Camargo is supported by an ISCIII research contract [Programa Miguel-Servet CP14/00114]. We would like to thank the Córdoba branch of the Biobank of the Sistema Sanitario Público de Andalucía (Andalusia, Spain) for providing the biological human samples, Jose Andrés Morales Martínez for his technical assistance and the EASP (Escuela Andaluza de Salud Pública), Granada, Spain, for the randomization process performed for this study.

References

- Berg, R.D., 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4, 430–435.
- Brunsgaard, H., Pedersen, M., Pedersen, B.K., 2001. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr. Opin. Hematol.* 8, 131–136.
- Camargo, A., Delgado-Lista, J., Garcia-Rios, A., Cruz-Teno, C., Yubero-Serrano, E.M., Perez-Martinez, P., Gutierrez-Mariscal, F.M., Lora-Aguilar, P., Rodriguez-Cantalejo, F., Fuentes-Jimenez, F., Tinahones, F.J., Malagon, M.M., Perez-Jimenez, F., Lopez-Miranda, J., 2012. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. *Br. J. Nutr.* 108, 500–508.
- Camargo, A., Rangel-Zuniga, O.A., Haro, C., Meza-Miranda, E.R., Pena-Orihuela, P., Meneses, M.E., Marin, C., Yubero-Serrano, E.M., Perez-Martinez, P., Delgado-Lista, J., Fernandez-Real, J.M., Luque de Castro, M.D., Tinahones, F.J., Lopez-Miranda, J., Perez-Jimenez, F., 2014. Olive oil phenolic compounds decrease the postprandial inflammatory response by reducing postprandial plasma lipopolysaccharide levels. *Food Chem.* 162, 161–171.
- Can, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delmee, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrieres, J., Tanti, J.F., Gibson, G.R., Castella, L., Delzenne, N.M., Alessi, M.C., Burcelin, R., 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772.
- Chung, H.Y., Sung, B., Jung, K.J., Zou, Y., Yu, B.P., 2006. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 572–581.
- Cruz-Teno, C., Perez-Martinez, P., Delgado-Lista, J., Yubero-Serrano, E.M., Garcia-Rios, A., Marin, C., Gomez, P., Jimenez-Gomez, Y., Camargo, A., Rodriguez-Cantalejo, F., Malagon, M.M., Perez-Jimenez, F., Roche, H.M., Lopez-Miranda, J., 2012. Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 854–865.
- Ferguson, J.F., Mulvey, C.K., Patel, P.N., Shah, R.Y., Doveikis, J., Zhang, W., Tabita-Martinez, J., Terembula, K., Eiden, M., Koulman, A., Griffin, J.L., Mehta, N.N., Shah, R., Probert, K.J., Song, W.L., Reilly, M.P., 2014. Omega-3 PUFA supplementation and the response to evoked endotoxemia in healthy volunteers. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 601–613.
- Ghanim, H., Abuaysheh, S., Sia, C.L., Korzeniewski, K., Chaudhuri, A., Fernandez-Real, J.M., Dandona, P., 2009. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care* 32, 2281–2287.
- Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., de Villiers, W., Eckhardt, E., 2009. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J. Lipid Res.* 50, 90–97.
- Gutsmann, T., Muller, M., Carroll, S.F., MacKenzie, R.C., Wiese, A., Seydel, U., 2001. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect. Immun.* 69, 6942–6950.
- Herrera, M.D., Mingorance, C., Rodriguez-Rodriguez, R., Alvarez de Sotomayor, M., 2010. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res. Rev.* 9, 142–152.
- Hietbrink, F., Besselink, M.G., Renooij, W., de Smet, M.B., Draisma, A., van der Hoeven, H., Pickkers, P., 2009. Systemic inflammation increases intestinal permeability during experimental human endotoxemia. *Shock* 32, 374–378.
- Jimenez-Gomez, Y., Lopez-Miranda, J., Blanco-Colio, L.M., Marin, C., Perez-Martinez, P., Ruano, J., Paniagua, J.A., Rodriguez, F., Egidio, J., Perez-Jimenez, F., 2009. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis* 204, e70–76.
- Jimenez-Gomez, Y., Marin, C., Perez-Martinez, P., Hartwich, J., Malczewska-Malec, M., Golabek, I., Kiec-Wilk, B., Cruz-Teno, C., Rodriguez, F., Gomez, P., Gomez-Luna, M.J., Defoort, C., Gibney, M.J., Perez-Jimenez, F., Roche, H.M., Lopez-Miranda, J., 2010. A low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with long-chain (n-3) fatty acids alters the postprandial lipoprotein profile in patients with metabolic syndrome. *J. Nutr.* 140, 1595–1601.
- Kaliannan, K., Wang, B., Li, X.Y., Kim, K.J., Kang, J.X., 2015. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci. Rep.* 5, 11276.
- Kriszbacher, I., Koppan, M., Bodis, J., 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 353, 429–430 (author reply 429–430).
- Lopez-Miranda, J., Perez-Martinez, P., Marin, C., Fuentes, F., Delgado, J., Perez-Jimenez, F., 2007. Dietary fat, genes and insulin sensitivity. *J. Mol. Med. (Berl)* 85, 213–226.
- Mahmoudi, M., Curzen, N., Gallagher, P.J., 2007. Atherogenesis: the role of inflammation and infection. *Histopathology* 50, 535–546.
- Mani, V., Hollis, J.H., Gabler, N.K., 2013. Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. *Nutr. Metab. (Lond.)* 10, 6.
- Martinez-Gonzalez, M.A., Fernandez-Jarne, E., Serrano-Martinez, M., Wright, M., Gomez-Gracia, E., 2004. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 1550–1552.
- Meneses, M.E., Camargo, A., Perez-Martinez, P., Delgado-Lista, J., Cruz-Teno, C., Jimenez-Gomez, Y., Paniagua, J.A., Gutierrez-Mariscal, F.M., Tinahones, F.J., Vidal-Puig, A., Roche, H.M., Perez-Jimenez, F., Malagon, M.M., Lopez-Miranda, J., 2011. Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome after the intake of different dietary models. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1759–1770.
- Minter, R.M., Bi, X., Ben-Josef, G., Wang, T., Hu, B., Arbabi, S., Hemmila, M.R., Wang, S.C., Remick, D.G., Su, G.L., 2009. LPS-binding protein mediates LPS-induced liver

- injury and mortality in the setting of biliary obstruction. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G45–54.
- Momiyama, Y., Adachi, H., Fairweather, D., Ishizaka, N., Saita, E., 2014. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *Clin. Med. Insights Cardiol.* 8, 67–70.
- Neal, M.D., Leaphart, C., Levy, R., Prince, J., Billiar, T.R., Watkins, S., Li, J., Cetin, S., Ford, H., Schreiber, A., Hackam, D.J., 2006. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J. Immunol.* 176, 3070–3079.
- Neish, A.S., 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 136, 65–80.
- Neves, A.L., Coelho, J., Couto, L., Leite-Moreira, A., Roncon-Albuquerque Jr., R., 2013. Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *J. Mol. Endocrinol.* 51, R51–64.
- O'Grada, C.M., Morine, M.J., Morris, C., Ryan, M., Dillon, E.T., Walsh, M., Gibney, E.R., Brennan, L., Gibney, M.J., Roche, H.M., 2014. PBMCs reflect the immune component of the WAT transcriptome—implications as biomarkers of metabolic health in the postprandial state. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 808–820.
- van Oostrom, A.J., Rabelink, T.J., Verseyden, C., Sijmonsma, T.P., Plokker, H.W., De Jaegere, P.P., Cabezas, M.C., 2004. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 177, 175–182.
- Parks, E.J., 2001. Recent findings in the study of postprandial lipemia. *Curr Atheroscler Rep* 3, 462–470.
- Pendyala, S., Walker, J.M., Holt, P.R., 2012. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology* 142 (1100–1101), e1102.
- Ross, R., 1999. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115–126.
- Sanchez-Tainta, A., Estruch, R., Bullo, M., Corella, D., Gomez-Gracia, E., Fiol, M., Algorta, J., Covas, M.I., Lapetra, J., Zazpe, I., Ruiz-Gutierrez, V., Ros, E., Martinez-Gonzalez, M.A., Group, P., 2008. Adherence to a Mediterranean-type diet and reduced prevalence of clustered cardiovascular risk factors in a cohort of 3,204 high-risk patients. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 15, 589–593.
- Service, H.N.I., 1987. Agriculture Handbook No 8 Department of Agriculture Composition of Foods. US Government Printing Office, Washington, DC.
- Tremaroli, V., Backhed, F., 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249.
- Triantafyllou, M., Miyake, K., Golenbock, D.T., Triantafyllou, K., 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell Sci.* 115, 2603–2611.
- Varela, G., 1980. Tablas de Composición de Alimentos (Spanish) (Food Composition Tables). Instituto de Nutrición, CSIC, Madrid.

V. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

El consumo de una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados, en comparación con una dieta rica en ácidos grasos saturados o una dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono complejos con o sin suplementar con ácidos grasos poliinsaturados n-3, produce una menor acumulación de productos finales de glicación avanzada y una menor absorción intestinal de endotoxinas bacterianas (LPS), reduciendo así el estado pro-inflamatorio postprandial y el estrés oxidativo en pacientes con síndrome metabólico y en población sana de edad avanzada.

Esta conclusión general se divide en 4 apartados, los cuales se corresponden con los cinco artículos de esta Tesis:

Conclusión 1: El menor contenido en productos finales de glicación avanzada proporcionado por el consumo de la dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados, en comparación con otros modelos de dieta con diferente composición y calidad en la grasa, produjo una reducción de los niveles de los productos finales de glicación avanzada modulando la expresión de genes relacionados con el metabolismo de dichas glicotoxinas, tanto en pacientes con síndrome metabólico (**Artículo 1**) como en una población sana de edad avanzada (**Artículo 2**), lo cual puede usarse como un enfoque terapéutico para reducir la incidencia de síndrome metabólico y enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

Conclusión 2: El aporte exógeno de coenzima Q₁₀ produce un efecto adicional en la reducción de los niveles de los productos finales de glicación avanzada y en la modulación del metabolismo de dichas glicotoxinas, particularmente durante el estado postprandial (**Artículo 3**).

Conclusión 3: Nuestros resultados sugieren que el consumo de una dieta SFA aumenta la absorción intestinal de LPS, lo que a su vez, aumenta los niveles de endotoxemia postprandial y la respuesta inflamatoria postprandial tanto en pacientes con síndrome metabólico (**Artículo 4**) como en una población sana de edad avanzada (**Artículo 5**).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Enzi G, Busetto L, Inelmen EM, Coin A, Sergi G. Historical perspective: visceral obesity and related comorbidity in Joannes Baptista Morgagni's 'De sedibus et causis morborum per anatomen indagata'. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:534-5.
2. E K. Studien über das Hypertonie-Hyperglykemie-Hyperurikemie syndrome. *Zentralblatt für Innere Medizin* 1923;44:105-27.
3. Marañón G. 'Prädiabetische Zustände'. Abhandlungen aus den grenzgebiete der Inneren Secretion. Wissenschaftliche Verlags Buchhandlung Rudolf Novak 1927:12-42.
4. Vague J. La differentiation sexuelle. *Presse Med* 1947;55:339-40.
5. Reaven G, Calciano A, Cody R, Lucas C, Miller R. Carbohydrate Intolerance and Hyperlipemia in Patients with Myocardial Infarction without Known Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1963;23:1013-23.
6. Camus JP. [Gout, diabetes, hyperlipemia: a metabolic trisyndrome]. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1966;33:10-4.
7. Avogaro P CC. European association for the study of diabetes. *Diabetologia* 1965;1:137.
8. Mehnert H, Kuhlmann H. [Hypertension and diabetes mellitus]. *Dtsch Med J* 1968;19:567-71.
9. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
10. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14:173-94.
11. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 1992;41:715-22.
12. Ferrannini E, Haffner SM, Mitchell BD, Stern MP. Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia* 1991;34:416-22.
13. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999;16:442-3.
14. Li M, Cai JF, Chiu JF. Arsenic induces oxidative stress and activates stress gene expressions in cultured lung epithelial cells. *J Cell Biochem* 2002;87:29-38.
15. Zimmet P, KG MMA, Serrano Rios M. [A new international diabetes federation worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results]. *Rev Esp Cardiol* 2005;58:1371-6.
16. American College of Endocrinology Task Force on the Insulin Resistance Syndrome: American College of Endocrinology Position Statement on the Insulin Resistance Syndrome. *Endocr Pract* 2003;9:236-52.
17. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005;366:1059-62.
18. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006;23:469-80.
19. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.
20. Tan CE, Ma S, Wai D, Chew SK, Tai ES. Can we apply the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel definition of the metabolic syndrome to Asians? *Diabetes Care* 2004;27:1182-6.
21. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735-52.
22. Magliano DJ, Shaw JE, Zimmet PZ. How to best define the metabolic syndrome. *Ann Med* 2006;38:34-41.

23. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004;33:351-75, table of contents.
24. Cameron AJ, Magliano DJ, Zimmet PZ, Welborn T, Shaw JE. The metabolic syndrome in Australia: prevalence using four definitions. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:471-8.
25. Cameron AJ, Magliano DJ, Zimmet PZ, et al. The metabolic syndrome as a tool for predicting future diabetes: the AusDiab study. *J Intern Med* 2008;264:177-86.
26. Cameron A. The metabolic syndrome: validity and utility of clinical definitions for cardiovascular disease and diabetes risk prediction. *Maturitas* 2010;65:117-21.
27. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Jama* 2002;288:2709-16.
28. Takeuchi H, Saitoh S, Takagi S, et al. Metabolic syndrome and cardiac disease in Japanese men: applicability of the concept of metabolic syndrome defined by the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III to Japanese men--the Tanno and Sobetsu Study. *Hypertens Res* 2005;28:203-8.
29. Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A, Chen RS. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 2004;109:42-6.
30. Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 2004;110:380-5.
31. Regueiro J, López, C., González, S., Martínez, E. . Células y tejidos del sistema inmune. *Panamericana* 2000:9-20.
32. Fleck A. Clinical and nutritional aspects of changes in acute-phase proteins during inflammation. *Proc Nutr Soc* 1989;48:347-54.
33. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-54.
34. Michie HR. Metabolism of sepsis and multiple organ failure. *World J Surg* 1996;20:460-4.
35. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996;24:163-72.
36. Jana A, Krett NL, Guzman G, et al. NFkB is essential for activin-induced colorectal cancer migration via upregulation of PI3K-MDM2 pathway. *Oncotarget* 2017;8:37377-93.
37. Nagel S, Ehrentaut S, Meyer C, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RA. NFkB is activated by multiple mechanisms in hairy cell leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2015;54:418-32.
38. Chen SF, Chao YL, Shen YC, Chen CH, Weng CF. Resequencing and association study of the NFkB activating protein-like gene (NKAPL) in schizophrenia. *Schizophr Res* 2014;157:169-74.
39. Ozcan L, Otunctemur A, Polat EC, Ozbek E, Kirecci SL, Somay A. Selective Nuclear Factor Kappa b (NFkB) Inhibitor, Pyrrolidinium Dithiocarbamate Prevents, Long-Term Histologic Damage in Ischemia-Reperfusion Injuries after Delayed Testicular Torsion. *Urol J* 2016;13:2702-6.
40. Barroso M, Kao D, Blom HJ, et al. S-adenosylhomocysteine induces inflammation through NFkB: A possible role for EZH2 in endothelial cell activation. *Biochim Biophys Acta* 2016;1862:82-92.
41. Antoon JW, White MD, Slaughter EM, et al. Targeting NFkB mediated breast cancer chemoresistance through selective inhibition of sphingosine kinase-2. *Cancer Biol Ther* 2011;11:678-89.
42. Lipponen A, Paananen J, Puhakka N, Pitkanen A. Analysis of Post-Traumatic Brain Injury Gene Expression Signature Reveals Tubulins, Nfe2l2, Nfkb, Cd44, and S100a4 as Treatment Targets. *Sci Rep* 2016;6:31570.

43. Sun XF, Zhang H. NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol Histopathol* 2007;22:1387-98.
44. Popko K, Gorska E, Stelmazczyk-Emmel A, et al. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF-alpha and the development of inflammation in obese subjects. *Eur J Med Res* 2010;15 Suppl 2:120-2.
45. Miron N, Miron MM, Milea VG, Cristea V. Proinflammatory cytokines: an insight into pancreatic oncogenesis. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2010;69:183-9.
46. Grijo NN, Borra RC, Sdepanian VL. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines present in the acute phase of experimental colitis treated with *Saccharomyces boulardii*. *Dig Dis Sci* 2010;55:2498-504.
47. Brown CM, Mulcahey TA, Filipek NC, Wise PM. Production of proinflammatory cytokines and chemokines during neuroinflammation: novel roles for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 2010;151:4916-25.
48. Speckmann B, Pinto A, Winter M, Forster I, Sies H, Steinbrenner H. Proinflammatory cytokines down-regulate intestinal selenoprotein P biosynthesis via NOS2 induction. *Free Radic Biol Med* 2010;49:777-85.
49. Vigetti D, Genasetti A, Karousou E, et al. Proinflammatory cytokines induce hyaluronan synthesis and monocyte adhesion in human endothelial cells through hyaluronan synthase 2 (HAS2) and the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway. *J Biol Chem* 2010;285:24639-45.
50. Yu M, Wen N, Wenzhong Z, Yuanchang X, Xiaoming D, Yongjin L. Effect of repeated ischaemic preconditioning on TLR4 and proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta in myocardial ischaemia-reperfusion injury in a rat model. *Arch Med Sci* 2010;6:843-7.
51. Baravalle C, Dallard BE, Cadoche MC, et al. Proinflammatory cytokines and CD14 expression in mammary tissue of cows following intramammary inoculation of *Panax ginseng* at drying off. *Vet Immunol Immunopathol* 2011;144:52-60.
52. van de Veerdonk FL, Netea MG. New Insights in the Immunobiology of IL-1 Family Members. *Front Immunol* 2013;4:167.
53. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2010;10:89-102.
54. Kugelberg E. Innate immunity: IL-1beta activation under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 2016;16:594-5.
55. Ito Y, Kaneko N, Iwasaki T, Morikawa S, Kaneko K, Masumoto J. IL-1 as a target in inflammation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2015;15:206-11.
56. Krumm B, Xiang Y, Deng J. Structural biology of the IL-1 superfamily: key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses. *Protein Sci* 2014;23:526-38.
57. Ballak DB, Stienstra R, Tack CJ, Dinarello CA, van Diepen JA. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine* 2015;75:280-90.
58. Caucheteux SM, Hu-Li J, Guo L, et al. IL-1beta enhances inflammatory TH2 differentiation. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:898-901 e4.
59. Mailer RK, Joly AL, Liu S, Elias S, Tegner J, Andersson J. IL-1beta promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Sci Rep* 2015;5:14674.
60. Karmakar M, Katsnelson M, Malak HA, et al. Neutrophil IL-1beta processing induced by pneumolysin is mediated by the NLRP3/ASC inflammasome and caspase-1 activation and is dependent on K⁺ efflux. *J Immunol* 2015;194:1763-75.
61. Kunisch E, Kinne RW, Alsalameh RJ, Alsalameh S. Pro-inflammatory IL-1beta and/or TNF-alpha up-regulate matrix metalloproteinases-1 and -3 mRNA in chondrocyte subpopulations potentially pathogenic in osteoarthritis: in situ hybridization studies on a single cell level. *Int J Rheum Dis* 2016;19:557-66.
62. Tosello Boari J, Acosta Rodriguez EV. IL-1beta/CD14 pathway induces IL-17 production: Dendritic cells activated with IL-1beta set Th17 cells on fire by CD14-mediated mechanisms. *Immunol Cell Biol* 2016;94:903-4.

63. Hermann GE, Rogers RC. TNFalpha: a trigger of autonomic dysfunction. *Neuroscientist* 2008;14:53-67.
64. Vincent C, Findlay DM, Welldon KJ, et al. Pro-inflammatory cytokines TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNFalpha induce the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent expression of sclerostin in human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2009;24:1434-49.
65. Dong J, Jimi E, Zeiss C, Hayden MS, Ghosh S. Constitutively active NF-kappaB triggers systemic TNFalpha-dependent inflammation and localized TNFalpha-independent inflammatory disease. *Genes Dev* 2010;24:1709-17.
66. Ishii D, Schenk AD, Baba S, Fairchild RL. Role of TNFalpha in early chemokine production and leukocyte infiltration into heart allografts. *Am J Transplant* 2010;10:59-68.
67. Koutoulaki A, Langley M, Sloan AJ, Aeschlimann D, Wei XQ. TNFalpha and TGF-beta1 influence IL-18-induced IFNgamma production through regulation of IL-18 receptor and T-bet expression. *Cytokine* 2010;49:177-84.
68. Morgan MJ, Liu ZG. Reactive oxygen species in TNFalpha-induced signaling and cell death. *Mol Cells* 2010;30:1-12.
69. Paredes D, Acosta S, Gemma C, Bickford PC. Role of TNFalpha Induced Inflammation in Delay Eyeblink Conditioning in Young and Aged Rats. *Aging Dis* 2010;1:191-8.
70. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* 2010;5:e9016.
71. Aue G, Nelson Lozier J, Tian X, et al. Inflammation, TNFalpha and endothelial dysfunction link lenalidomide to venous thrombosis in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2011;86:835-40.
72. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, et al. The inflammatory cytokines TWEAK and TNFalpha reduce renal klotho expression through NFkappaB. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1315-25.
73. Mori T, Miyamoto T, Yoshida H, et al. IL-1beta and TNFalpha-initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. *Int Immunol* 2011;23:701-12.
74. Scharl M, McCole DF, Weber A, et al. Protein tyrosine phosphatase N2 regulates TNFalpha-induced signalling and cytokine secretion in human intestinal epithelial cells. *Gut* 2011;60:189-97.
75. Blanchard F, Duplomb L, Baud'huin M, Brounais B. The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:19-28.
76. Starr ME, Evers BM, Saito H. Age-associated increase in cytokine production during systemic inflammation: adipose tissue as a major source of IL-6. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009;64:723-30.
77. Zhang X, Yin P, Di D, et al. IL-6 regulates MMP-10 expression via JAK2/STAT3 signaling pathway in a human lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer Res* 2009;29:4497-501.
78. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One* 2010;5:e14247.
79. Chavez-Sanchez L, Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, et al. The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1beta, IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids Health Dis* 2010;9:117.
80. Lai S, Fishman EK, Lai H, Pannu H, Detrick B. Serum IL-6 levels are associated with significant coronary stenosis in cardiovascularly asymptomatic inner-city black adults in the US. *Inflamm Res* 2009;58:15-21.
81. Kasperska-Zajac A, Sztylec J, Machura E, Jop G. Plasma IL-6 concentration correlates with clinical disease activity and serum C-reactive protein concentration in chronic urticaria patients. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1386-91.

82. Kyriazi E, Tsiotra PC, Boutati E, et al. Effects of adiponectin in TNF-alpha, IL-6, and IL-10 cytokine production from coronary artery disease macrophages. *Horm Metab Res* 2011;43:537-44.
83. Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond)* 2009;117:95-109.
84. Lee JS, Yang EJ, Kim IS. The roles of MCP-1 and protein kinase C delta activation in human eosinophilic leukemia EoL-1 cells. *Cytokine* 2009;48:186-95.
85. Piccinini AM, Knebl K, Rek A, Wildner G, Diedrichs-Mohring M, Kungl AJ. Rationally evolving MCP-1/CCL2 into a decoy protein with potent anti-inflammatory activity in vivo. *J Biol Chem* 2010;285:8782-92.
86. Zhang J, Chen L, Xiao M, Wang C, Qin Z. FSP1+ fibroblasts promote skin carcinogenesis by maintaining MCP-1-mediated macrophage infiltration and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2011;178:382-90.
87. Wakabayashi I, Takeda Y. Inhibitory effects of resveratrol on MCP-1, IL-6, and IL-8 production in human coronary artery smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2013;386:835-9.
88. Bach JP, Rinn B, Meyer B, Dodel R, Bacher M. Role of MIF in inflammation and tumorigenesis. *Oncology* 2008;75:127-33.
89. Grieb G, Merk M, Bernhagen J, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker. *Drug News Perspect* 2010;23:257-64.
90. Edwards KM, Bosch JA, Engeland CG, Cacioppo JT, Marucha PT. Elevated macrophage migration inhibitory factor (MIF) is associated with depressive symptoms, blunted cortisol reactivity to acute stress, and lowered morning cortisol. *Brain Behav Immun* 2010;24:1202-8.
91. Li WW, Jin XK, He L, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of macrophage migration inhibitory protein (MIF) in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 2011;30:324-9.
92. van der Vorst EP, Doring Y, Weber C. MIF and CXCL12 in Cardiovascular Diseases: Functional Differences and Similarities. *Front Immunol* 2015;6:373.
93. White DA, Fang L, Chan W, et al. Pro-inflammatory action of MIF in acute myocardial infarction via activation of peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* 2013;8:e76206.
94. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 2007;15:2223-68.
95. Fingleton B. MMPs as therapeutic targets--still a viable option? *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:61-8.
96. Fisher JF, Mobashery S. Mechanism-based profiling of MMPs. *Methods Mol Biol* 2010;622:471-87.
97. Muller-Quernheim J. MMPs are regulatory enzymes in pathways of inflammatory disorders, tissue injury, malignancies and remodelling of the lung. *Eur Respir J* 2011;38:12-4.
98. Nair SA, Jagadeeshan S, Indu R, Sudhakaran PR, Pillai MR. How intact is the basement membrane? Role of MMPs. *Adv Exp Med Biol* 2012;749:215-32.
99. Moesgaard SG, Aupperle H, Rajamaki MM, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in advanced canine myxomatous mitral valve disease. *Res Vet Sci* 2014;97:560-7.
100. Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* 2013;93:1-21.
101. Villarreal-Molina MT, Antuna-Puente B. Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie* 2012;94:2143-9.
102. Stejskal D, Adamovska S, Bartek J, Jurakova R, Proskova J. Resistin - concentrations in persons with type 2 diabetes mellitus and in individuals with acute inflammatory disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2003;147:63-9.
103. Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 2008;39:715-28.

104. Despres JP. Obesity and cardiovascular disease: weight loss is not the only target. *Can J Cardiol* 2015;31:216-22.
105. Rothberg AE, Halter JB. Obesity and diabetes in an aging population: time to rethink definitions and management? *Clin Geriatr Med* 2015;31:1-15, vii.
106. Llada Suarez R, Del Fresno Marques L, Diaz Martin JJ, Malaga Guerrero S, Rey Galan C. [Obesity in Oviedo: Prevalence and time trends from 1992 to 2012]. *An Pediatr (Barc)* 2015;82:363-5.
107. Peltzer K, Pengpid S, Samuels TA, et al. Prevalence of overweight/obesity and its associated factors among university students from 22 countries. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11:7425-41.
108. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Arch Med Sci* 2017;13:851-63.
109. Piche ME, Weisnagel SJ, Corneau L, Nadeau A, Bergeron J, Lemieux S. Contribution of abdominal visceral obesity and insulin resistance to the cardiovascular risk profile of postmenopausal women. *Diabetes* 2005;54:770-7.
110. Bays HE. Adiposopathy, diabetes mellitus, and primary prevention of atherosclerotic coronary artery disease: treating "sick fat" through improving fat function with antidiabetes therapies. *Am J Cardiol* 2012;110:4B-12B.
111. Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am J Med Genet A* 2007;143A:3016-34.
112. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge. *N Engl J Med* 2007;356:213-5.
113. Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva ME. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:145-50.
114. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 2004;110:1564-71.
115. Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7265-70.
116. De Pergola G, Pannaciuoli N. Coagulation and fibrinolysis abnormalities in obesity. *J Endocrinol Invest* 2002;25:899-904.
117. Sheu WH, Chang TM, Lee WJ, et al. Effect of weight loss on proinflammatory state of mononuclear cells in obese women. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1033-8.
118. Murdolo G, Smith U. The dysregulated adipose tissue: a connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16 Suppl 1:S35-8.
119. Beck E, Esser N, Paquot N, Scheen AJ. [Metabolically obese normal-weight individuals and metabolically healthy, but obese, subjects]. *Rev Med Suisse* 2009;5:1644-6, 8-9.
120. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 2011;121:2094-101.
121. Ceska R. Clinical implications of the metabolic syndrome. *Diab Vasc Dis Res* 2007;4 Suppl 3:S2-4.
122. Boden G. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008;37:635-46, viii-ix.
123. Turner RC, Millns H, Neil HA, et al. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *Bmj* 1998;316:823-8.
124. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, et al. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997;95:69-75.

125. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama* 2002;287:356-9.
126. Cardona F, Tinahones, F.J. Relation Of Postprandial Hypertriglyceridemia with Insulin Resistance in Patients with the Metabolic Syndrome. *Postprandial hypertriglyceridemia & metabolic syndrome. Endocrinología y Nutrición* 2006;53:345-52.
127. Khoury DE, Hwalla N, Frochot V, Lacorte JM, Chabert M, Kalopissis AD. Postprandial metabolic and hormonal responses of obese dyslipidemic subjects with metabolic syndrome to test meals, rich in carbohydrate, fat or protein. *Atherosclerosis* 2010;210:307-13.
128. Ruotolo G, Howard BV. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep* 2002;4:494-500.
129. van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Verseyden C, et al. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 2004;177:175-82.
130. Soumian S, Albrecht C, Davies AH, Gibbs RG. ABCA1 and atherosclerosis. *Vasc Med* 2005;10:109-19.
131. Lu K, Ding R, Wang L, Wu S, Chen J, Hu D. Association between prevalence of hypertension and components of metabolic syndrome: the data from Kailuan community. *Clin Exp Hypertens* 2015;37:303-7.
132. Ratto E, Viazzi F, Verzola D, et al. Metabolic syndrome is associated with left ventricular dilatation in primary hypertension. *J Hum Hypertens* 2016;30:158-63.
133. Sucato V, Novo G, Evola S, Novo S. Coronary microvascular dysfunction in patients with diabetes, hypertension and metabolic syndrome. *Int J Cardiol* 2015;186:96-7.
134. Zhong C, Zhong X, Xu T, et al. Combined effects of hypertension and heart rate on the risk of stroke and coronary heart disease: a population-based prospective cohort study among Inner Mongolians in China. *Hypertens Res* 2015;38:883-8.
135. Watson T, Goon PK, Lip GY. Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1079-88.
136. Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002;106:913-9.
137. Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1668-73.
138. Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Crowder K, Cronin J, Baron AD. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes* 2000;49:1231-8.
139. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *Jama* 2003;289:1799-804.
140. Aronne LJ. Classification of obesity and assessment of obesity-related health risks. *Obes Res* 2002;10 Suppl 2:105S-15S.
141. Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006;98:121-8.
142. Russo C, Olivieri O, Girelli D, et al. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1998;16:1267-71.
143. Abdilla N, Tormo MC, Fabia MJ, Chaves FJ, Saez G, Redon J. Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007;21:68-75.
144. Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol* 2015;31:631-41.
145. Brito R, Castillo G, Gonzalez J, Valls N, Rodrigo R. Oxidative stress in hypertension: mechanisms and therapeutic opportunities. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2015;123:325-35.

146. Luo H, Wang X, Chen C, et al. Oxidative stress causes imbalance of renal renin angiotensin system (RAS) components and hypertension in obese Zucker rats. *J Am Heart Assoc* 2015;4.
147. Annor FB, Goodman M, Okosun IS, et al. Oxidative stress, oxidative balance score, and hypertension among a racially diverse population. *J Am Soc Hypertens* 2015;9:592-9.
148. Allison SJ. Hypertension: Oxidative stress and immune activation in hypertension. *Nat Rev Nephrol* 2016;12:4.
149. Dikalov SI, Dikalova AE. Contribution of mitochondrial oxidative stress to hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2016;25:73-80.
150. Rincon J, Correia D, Arcaya JL, et al. Role of Angiotensin II type 1 receptor on renal NAD(P)H oxidase, oxidative stress and inflammation in nitric oxide inhibition induced-hypertension. *Life Sci* 2015;124:81-90.
151. Cejvanovic V, Asferg C, Kjaer LK, et al. Markers of oxidative stress in obese men with and without hypertension. *Scand J Clin Lab Invest* 2016;76:620-5.
152. Reisin E, Owen J. Treatment: special conditions. Metabolic syndrome: obesity and the hypertension connection. *J Am Soc Hypertens* 2015;9:156-9; quiz 60.
153. Falkner B, Cossrow ND. Prevalence of metabolic syndrome and obesity-associated hypertension in the racial ethnic minorities of the United States. *Curr Hypertens Rep* 2014;16:449.
154. Bhatti GK, Bhadada SK, Vijayvergiya R, Mastana SS, Bhatti JS. Metabolic syndrome and risk of major coronary events among the urban diabetic patients: North Indian Diabetes and Cardiovascular Disease Study-NIDCVD-2. *J Diabetes Complications* 2016;30:72-8.
155. Nag T, Ghosh A. Indian diabetes risk score and clustering of metabolic syndrome phenotype in a rural community of Asian Indian origin. *Diabetes Res Clin Pract* 2016;112:44-9.
156. Athyros VG, Mikhailidis DP. High incidence of metabolic syndrome further increases cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. Implications for everyday practice. *J Diabetes Complications* 2016;30:9-11.
157. Uribe-Wiechers AC, Janka-Zires M, Almeda-Valdes P, Lopez-Gutierrez J, Gomez-Perez FJ. Albuminuria and Glomerular Filtration Rate in Individuals with Type 1 Diabetes Mellitus: Contribution of Metabolic Syndrome. *Rev Invest Clin* 2015;67:266-72.
158. Ogedengbe OS, Ezeani IU, Chukwuonye, II, Anyabolu EN, Ozor, II, Eregie A. Evaluating the impact of type 2 diabetes mellitus on cardiovascular risk in persons with metabolic syndrome using the UKPDS risk engine. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2015;8:437-45.
159. Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:447-52.
160. Han TS, Williams K, Sattar N, Hunt KJ, Lean ME, Haffner SM. Analysis of obesity and hyperinsulinemia in the development of metabolic syndrome: San Antonio Heart Study. *Obes Res* 2002;10:923-31.
161. Aljada A, Ghanim H, Assian E, Dandona P. Tumor necrosis factor-alpha inhibits insulin-induced increase in endothelial nitric oxide synthase and reduces insulin receptor content and phosphorylation in human aortic endothelial cells. *Metabolism: clinical and experimental* 2002;51:487-91.
162. Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obes Res* 2004;12:180-6.
163. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol* 2013;87:1157-80.
164. Kirkwood TB, Kowald A. The free-radical theory of ageing--older, wiser and still alive: modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support. *Bioessays* 2012;34:692-700.
165. Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr* 1996;63:985S-90S.
166. Ramirez-Prieto MT, Garcia-Rio F, Villamor J. [Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring]. *Med Clin (Barc)* 2006;127:386-96.

167. Farrugia G, Balzan R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front Oncol* 2012;2:64.
168. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1507-16.
169. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 2013;1:244-57.
170. Trostchansky A, Bonilla L, Gonzalez-Perilli L, Rubbo H. Nitro-fatty acids: formation, redox signaling, and therapeutic potential. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:1257-65.
171. Murad F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 2006;355:2003-11.
172. Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davi G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:222-33.
173. Fernandez JM, Da Silva-Grigoletto ME, Caballero-Villarraso J, et al. Pre-exercise intake of different carbohydrates modifies ischemic reactive hyperemia after a session of anaerobic, but not after aerobic exercise. *J Strength Cond Res* 2010;24:1623-32.
174. Turrens JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 1997;17:3-8.
175. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1-13.
176. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004;16:42-7.
177. Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* 2005;65:16-27.
178. Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr* 2006;84:95-135.
179. Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 2006;38:769-89.
180. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* 2003;8:379-91.
181. Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:385-94.
182. Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, Dinkova-Kostova AT. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:1713-48.
183. Fukui T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1583-606.
184. Groeger G, Quiney C, Cotter TG. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:2655-71.
185. Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:319-26.
186. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J* 2008;275:3959-70.
187. Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:3289-303.
188. Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:1165-207.
189. Bjornstedt M, Hamberg M, Kumar S, Xue J, Holmgren A. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem* 1995;270:11761-4.
190. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007;43:4-15.

191. Aguirre R, May JM. Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *Pharmacol Ther* 2008;119:96-103.
192. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Jr., Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13659.
193. Mauch L, Lun A, O'Gorman MR, et al. Chronic granulomatous disease (CGD) and complete myeloperoxidase deficiency both yield strongly reduced dihydrorhodamine 123 test signals but can be easily discerned in routine testing for CGD. *Clin Chem* 2007;53:890-6.
194. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 2011;194:7-15.
195. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 2006;5:14.
196. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol* 2009;50:402-9.
197. Loukogeorgakis SP, van den Berg MJ, Sofat R, et al. Role of NADPH oxidase in endothelial ischemia/reperfusion injury in humans. *Circulation* 2010;121:2310-6.
198. Manton KG, Volovik S, Kulminski A. ROS effects on neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders: on environmental stresses of ionizing radiation. *Curr Alzheimer Res* 2004;1:277-93.
199. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-478.
200. Uribarri J, Cai W, Woodward M, et al. Elevated serum advanced glycation endproducts in obese indicate risk for the metabolic syndrome: a link between healthy and unhealthy obesity? *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:1957-66.
201. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
202. Yubero-Serrano EM, Delgado-Lista J, Pena-Orihuela P, et al. Oxidative stress is associated with the number of components of metabolic syndrome: LIPGENE study. *Exp Mol Med* 2013;45:e28.
203. Kanasi E, Ayilavarapu S, Jones J. The aging population: demographics and the biology of aging. *Periodontol 2000* 2016;72:13-8.
204. Dall TM, Gallo PD, Chakrabarti R, West T, Semilla AP, Storm MV. An aging population and growing disease burden will require a large and specialized health care workforce by 2025. *Health Aff (Millwood)* 2013;32:2013-20.
205. Tatar M. Can we develop genetically tractable models to assess healthspan (rather than life span) in animal models? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009;64:161-3.
206. Marques FZ, Markus MA, Morris BJ. The molecular basis of longevity, and clinical implications. *Maturitas* 2010;65:87-91.
207. Kirkwood TB, Austad SN. Why do we age? *Nature* 2000;408:233-8.
208. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R18-36.
209. Kong Y, Trabucco SE, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the mitochondria theory of aging. *Interdiscip Top Gerontol* 2014;39:86-107.
210. Kehler JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit Rev Toxicol* 2015;45:765-98.
211. Labunskyy VM, Gladyshev VN. Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:1362-72.
212. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300.
213. Pak JW, Herbst A, Bua E, Gokey N, McKenzie D, Aiken JM. Mitochondrial DNA mutations as a fundamental mechanism in physiological declines associated with aging. *Aging Cell* 2003;2:1-7.

214. Judge S, Leeuwenburgh C. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C1983-92.
215. Cabello-Verrugio C, Ruiz-Ortega M, Mosqueira M, Simon F. Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:8786564.
216. Burton DG. Cellular senescence, ageing and disease. *Age (Dordr)* 2009;31:1-9.
217. Bonakdar RA, Guarneri E. Coenzyme Q10. *Am Fam Physician* 2005;72:1065-70.
218. Saini R. Coenzyme Q10: The essential nutrient. *J Pharm Bioallied Sci* 2011;3:466-7.
219. Ross SM. Coenzyme q10: ubiquinone: a potent antioxidant and key energy facilitator for the heart. *Holist Nurs Pract* 2007;21:213-4.
220. Malchair P, Van Overmeire L, Boland A, Salmon E, Pierard L, Seutin V. [Coenzyme Q10: biochemistry, pathophysiology of its deficiency and potential benefit of an increased intake]. *Rev Med Liege* 2005;60:45-51.
221. Aalbers J. Coenzyme Q10, an anti-oxidant of value to reduce oxidative stress; also useful to reduce statin-induced myalgia. *Cardiovasc J Afr* 2012;23:170.
222. Lenaz G, Fato R, Di Bernardo S, et al. Localization and mobility of coenzyme Q in lipid bilayers and membranes. *Biofactors* 1999;9:87-93.
223. Santos-Gonzalez M, Gomez Diaz C, Navas P, Villalba JM. Modifications of plasma proteome in long-lived rats fed on a coenzyme Q10-supplemented diet. *Exp Gerontol* 2007;42:798-806.
224. Gokbel H, Atalay H, Okudan N, Solak Y, Belviranli M, Turk S. Coenzyme Q10 and its relation with oxidant and antioxidant system markers in patients with end-stage renal disease. *Ren Fail* 2011;33:677-81.
225. Singh A, Kumar A. Microglial Inhibitory Mechanism of Coenzyme Q10 Against Abeta (1-42) Induced Cognitive Dysfunctions: Possible Behavioral, Biochemical, Cellular, and Histopathological Alterations. *Front Pharmacol* 2015;6:268.
226. Yubero-Serrano EM, Gonzalez-Guardia L, Rangel-Zuniga O, et al. Postprandial antioxidant gene expression is modified by Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q(10) in elderly men and women. *Age (Dordr)* 2013;35:159-70.
227. Yang YK, Wang LP, Chen L, et al. Coenzyme Q10 treatment of cardiovascular disorders of ageing including heart failure, hypertension and endothelial dysfunction. *Clin Chim Acta* 2015;450:83-9.
228. Wautier MP, Tessier FJ, Wautier JL. [Advanced glycation end products: A risk factor for human health]. *Ann Pharm Fr* 2014;72:400-8.
229. Uribarri J, del Castillo MD, de la Maza MP, et al. Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. *Adv Nutr* 2015;6:461-73.
230. Tamanna N, Mahmood N. Food Processing and Maillard Reaction Products: Effect on Human Health and Nutrition. *Int J Food Sci* 2015;2015:526762.
231. Asadi M, Savaripoor N, Asadi Z, et al. Synthesis and characterization of some new Schiff base complexes of group 13 elements, ab initio studies, cytotoxicity and reaction with hydrogen peroxide. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2013;101:394-9.
232. Gillery P. [Assays of HbA1c and Amadori products in human biology]. *Ann Pharm Fr* 2014;72:330-6.
233. Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients* 2010;2:1247-65.
234. Uribarri J, Tuttle KR. Advanced glycation end products and nephrotoxicity of high-protein diets. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:1293-9.
235. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res* 2007;2007:61038.
236. Faist V, Erbersdobler HF. Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Ann Nutr Metab* 2001;45:1-12.
237. O'Brien J, Morrissey PA. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1989;28:211-48.

238. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* 2010;110:911-16 e12.
239. Goldberg T, Cai W, Peppia M, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 2004;104:1287-91.
240. Vlassara H, Striker G. Glycotoxins in the diet promote diabetes and diabetic complications. *Curr Diab Rep* 2007;7:235-41.
241. Cai W, Ramdas M, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:15888-93.
242. Chawla D, Bansal S, Banerjee BD, Madhu SV, Kalra OP, Tripathi AK. Role of advanced glycation end product (AGE)-induced receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. *Microvasc Res* 2014;95:1-6.
243. Vlassara H, Cai W, Goodman S, et al. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4483-91.
244. Wihler C, Schafer S, Schmid K, et al. Renal accumulation and clearance of advanced glycation end-products in type 2 diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme and vasopeptidase inhibition. *Diabetologia* 2005;48:1645-53.
245. Cai W, Gao QD, Zhu L, Peppia M, He C, Vlassara H. Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol Med* 2002;8:337-46.
246. Uribarri J, Cai W, Peppia M, et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007;62:427-33.
247. Bartakova V, Kollarova R, Kuricova K, Sebekova K, Belobradkova J, Kankova K. Serum carboxymethyl-lysine, a dominant advanced glycation end product, is increased in women with gestational diabetes mellitus. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2016;160:70-5.
248. Luft VC, Duncan BB, Schmidt MI, et al. Carboxymethyl lysine, an advanced glycation end product, and incident diabetes: a case-cohort analysis of the ARIC Study. *Diabet Med* 2016;33:1392-8.
249. Phillips SA, Thornalley PJ. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem* 1993;212:101-5.
250. Lyles GA, Chalmers J. The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochem Pharmacol* 1992;43:1409-14.
251. Kilhovd BK, Giardino I, Torjesen PA, et al. Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2003;52:163-7.
252. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6474-9.
253. Vlassara H, Torreggiani M, Post JB, Zheng F, Uribarri J, Striker GE. Role of oxidants/inflammation in declining renal function in chronic kidney disease and normal aging. *Kidney Int Suppl* 2009:S3-11.
254. Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11704-8.
255. Cai W, He JC, Zhu L, et al. Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. *Am J Pathol* 2008;173:327-36.
256. Vlassara H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17:436-43.

257. Cai W, He JC, Zhu L, Lu C, Vlassara H. Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:13801-6.
258. Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. AGE-receptor-1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66shc-dependent FKHRL1 phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C145-52.
259. Lu C, He JC, Cai W, Liu H, Zhu L, Vlassara H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11767-72.
260. Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:526-39.
261. Cai W, Torreggiani M, Zhu L, et al. AGER1 regulates endothelial cell NADPH oxidase-dependent oxidant stress via PKC-delta: implications for vascular disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298:C624-34.
262. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E685-94.
263. Napoli C, Martin-Padura I, de Nigris F, et al. Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2112-6.
264. Liang F, Kume S, Koya D. SIRT1 and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5:367-73.
265. Gao X, Zhang H, Schmidt AM, Zhang C. AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H491-8.
266. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 2004;63:582-92.
267. Branco-Madeira F, Lambrecht BN. High mobility group box-1 recognition: the beginning of a RAGEless era? *EMBO Mol Med* 2010;2:193-5.
268. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* 2010;59:249-55.
269. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010;28:367-88.
270. Sourris KC, Morley AL, Koitka A, et al. Receptor for AGEs (RAGE) blockade may exert its renoprotective effects in patients with diabetic nephropathy via induction of the angiotensin II type 2 (AT2) receptor. *Diabetologia* 2010;53:2442-51.
271. Cai W, He JC, Zhu L, et al. Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet: association with increased AGER1 expression. *Am J Pathol* 2007;170:1893-902.
272. Angoorani P, Ejtahed HS, Mirmiran P, Mirzaei S, Azizi F. Dietary consumption of advanced glycation end products and risk of metabolic syndrome. *Int J Food Sci Nutr* 2016;67:170-6.
273. Vlassara H, Cai W, Tripp E, et al. Oral AGE restriction ameliorates insulin resistance in obese individuals with the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 2016;59:2181-92.
274. Tessier FJ. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol Biol (Paris)* 2010;58:214-9.
275. Peppas M, Stavroulakis P, Raptis SA. Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen* 2009;17:461-72.
276. Monnier VM, Sell DR, Genuth S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:567-81.

277. Boehm BO, Schilling S, Rosinger S, et al. Elevated serum levels of N(epsilon)-carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, are associated with proliferative diabetic retinopathy and macular oedema. *Diabetologia* 2004;47:1376-9.
278. Aso Y, Inukai T, Tayama K, Takemura Y. Serum concentrations of advanced glycation endproducts are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 2000;37:87-92.
279. Kilhovd BK, Berg TJ, Birkeland KI, Thorsby P, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care* 1999;22:1543-8.
280. Uribarri J, Cai W, Ramdas M, et al. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care* 2011;34:1610-6.
281. Chao PC, Huang CN, Hsu CC, Yin MC, Guo YR. Association of dietary AGEs with circulating AGEs, glycated LDL, IL-1alpha and MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. *Eur J Nutr* 2010;49:429-34.
282. Ziemann S, Kass D. Advanced glycation end product cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. *Congest Heart Fail* 2004;10:144-9; quiz 50-1.
283. Yamagishi S, Ueda S, Matsui T, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) prevents advanced glycation end products (AGEs)-elicited endothelial nitric oxide synthase (eNOS) reduction through its anti-oxidative properties. *Protein Pept Lett* 2007;14:832-5.
284. Corman B, Duriez M, Poitevin P, et al. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1301-6.
285. Semba RD, Ferrucci L, Sun K, et al. Advanced glycation end products and their circulating receptors predict cardiovascular disease mortality in older community-dwelling women. *Aging Clin Exp Res* 2009;21:182-90.
286. Schleicher E, Weigert C, Rohrbach H, Nerlich A, Bachmeier B, Friess U. Role of glucooxidation and lipid oxidation in the development of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:343-54.
287. Semba RD, Fink JC, Sun K, Bandinelli S, Guralnik JM, Ferrucci L. Carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, and decline of renal function in older community-dwelling adults. *Eur J Nutr* 2009;48:38-44.
288. Semba RD, Ferrucci L, Fink JC, et al. Advanced glycation end products and their circulating receptors and level of kidney function in older community-dwelling women. *Am J Kidney Dis* 2009;53:51-8.
289. Rigalleau V, Cougnard-Gregoire A, Nov S, et al. Association of advanced glycation end products and chronic kidney disease with macroangiopathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2015;29:270-4.
290. Beisswenger PJ, Howell SK, Russell GB, Miller ME, Rich SS, Mauer M. Early progression of diabetic nephropathy correlates with methylglyoxal-derived advanced glycation end products. *Diabetes Care* 2013;36:3234-9.
291. Gohda T, Niewczas MA, Ficociello LH, et al. Circulating TNF receptors 1 and 2 predict stage 3 CKD in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:516-24.
292. Niewczas MA, Gohda T, Skupien J, et al. Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:507-15.
293. Peppas M, Uribarri J, Vlassara H. Aging and glycoxidant stress. *Hormones (Athens)* 2008;7:123-32.
294. Vinogradov E, St Michael F, Cox AD. Structure of the LPS O-chain from *Fusobacterium nucleatum* strain 12230. *Carbohydr Res* 2017;448:115-7.
295. MacLean LL, Perry MB, Chen W, Vinogradov E. The structure of the polysaccharide O-chain of the LPS from *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 17961. *Carbohydr Res* 2009;344:474-8.

296. Konev Iu V, Lazebnik LB. [Endotoxin (LPS) in the pathogenesis of atherosclerosis]. *Eksp Klin Gastroenterol* 2011;15-26.
297. Crhanova M, Malcova M, Mazgajova M, et al. LPS structure influences protein secretion in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* 2011;152:131-7.
298. Makimura Y, Asai Y, Sugiyama A, Ogawa T. Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Serratia marcescens* LPS. *J Med Microbiol* 2007;56:1440-6.
299. Bartelt M, Shashkov AS, Kochanowski H, Jann B, Jann K. Structure of the O-specific polysaccharide of the O22-antigen (LPS) from *Escherichia coli* O22:K13. *Carbohydr Res* 1994;254:203-12.
300. Vinogradov E, St Michael F, Cox AD. The structure of the LPS O-chain of *Fusobacterium nucleatum* strain 25586 containing two novel monosaccharides, 2-acetamido-2,6-dideoxy-l-altrose and a 5-acetimido-3,5,9-trideoxy-gluco-non-2-ulonic acid. *Carbohydr Res* 2017;440-441:10-5.
301. Ronco C. Lipopolysaccharide (LPS) from the cellular wall of Gram-negative bacteria, also known as endotoxin, is a key molecule in the pathogenesis of sepsis and septic shock. Preface. *Blood Purif* 2014;37 Suppl 1:1.
302. Li L, Yang Y, Wang Z, Gong F. Study of the effects of LPS on the TACE gene expression and its function. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2002;22:5-8.
303. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 1996;4:430-5.
304. Hietbrink F, Besselink MG, Renooij W, et al. Systemic inflammation increases intestinal permeability during experimental human endotoxemia. *Shock* 2009;32:374-8.
305. Neal MD, Leaphart C, Levy R, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol* 2006;176:3070-9.
306. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res* 2009;50:90-7.
307. Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *FASEB J* 2004;18:1117-9.
308. Kitchens RL, Thompson PA. Impact of sepsis-induced changes in plasma on LPS interactions with monocytes and plasma lipoproteins: roles of soluble CD14, LBP, and acute phase lipoproteins. *J Endotoxin Res* 2003;9:113-8.
309. Laugerette F, Alligier M, Bastard JP, et al. Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: Inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:1513-8.
310. Murdock JL, Nunez G. TLR4: The Winding Road to the Discovery of the LPS Receptor. *J Immunol* 2016;197:2561-2.
311. Park S, Shin HJ, Shah M, et al. TLR4/MD2 specific peptides stalled in vivo LPS-induced immune exacerbation. *Biomaterials* 2017;126:49-60.
312. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003;198:1043-55.
313. Vartanian KB, Stevens SL, Marsh BJ, Williams-Karnesky R, Lessov NS, Stenzel-Poore MP. LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury. *J Neuroinflammation* 2011;8:140.
314. Park EJ, Min HY, Chung HJ, Ahn YH, Pyee JH, Lee SK. Pinosylvin suppresses LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase expression via the MyD88-independent, but TRIF-dependent downregulation of IRF-3 signaling pathway in mouse macrophage cells. *Cell Physiol Biochem* 2011;27:353-62.
315. Lappin MJ, Brown V, Zaric SS, Lundy FT, Coulter WA, Irwin CR. Interferon-gamma stimulates CD14, TLR2 and TLR4 mRNA expression in gingival fibroblasts increasing responsiveness to bacterial challenge. *Arch Oral Biol* 2016;61:36-43.

316. Ho CC, Luo YH, Chuang TH, Lin P. Quantum dots induced interferon beta expression via TRIF-dependent signaling pathways by promoting endocytosis of TLR4. *Toxicology* 2016;344-346:61-70.
317. Diomedea F, Zingariello M, Cavalcanti M, et al. MyD88/ERK/NFkB pathways and pro-inflammatory cytokines release in periodontal ligament stem cells stimulated by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Histochem* 2017;61:2791.
318. Wang J, Dong B, Tan Y, Yu S, Bao YX. A study on the immunomodulation of polysaccharopeptide through the TLR4-TIRAP/MAL-MyD88 signaling pathway in PBMCs from breast cancer patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2013;35:497-504.
319. Jang JC, Li J, Gambini L, et al. Human resistin protects against endotoxic shock by blocking LPS-TLR4 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E10399-E408.
320. Hamano R, Takahashi HK, Iwagaki H, et al. Stimulation of adenosine A2A receptor inhibits LPS-induced expression of intercellular adhesion molecule 1 and production of TNF-alpha in human peripheral blood mononuclear cells. *Shock* 2008;29:154-9.
321. Strauss J, Burnham NA, Camesano TA. Atomic force microscopy study of the role of LPS O-antigen on adhesion of *E. coli*. *J Mol Recognit* 2009;22:347-55.
322. Bradfield PF, Johnson-Leger CA, Zimmerli C, Imhof BA. LPS differentially regulates adhesion and transendothelial migration of human monocytes under static and flow conditions. *Int Immunol* 2008;20:247-57.
323. Sikorski K, Chmielewski S, Przybyl L, et al. STAT1-mediated signal integration between IFNgamma and LPS leads to increased EC and SMC activation and monocyte adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300:C1337-44.
324. Martins JO, Zanoni FL, Martins DO, et al. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through nuclear factor-kappaB activation in LPS-induced acute lung injury in rats. *Shock* 2009;31:404-9.
325. Hortelano S, Lopez-Fontal R, Traves PG, et al. ILK mediates LPS-induced vascular adhesion receptor expression and subsequent leucocyte trans-endothelial migration. *Cardiovasc Res* 2010;86:283-92.
326. Min BK, Suk K, Lee WH. Stimulation of CD107 affects LPS-induced cytokine secretion and cellular adhesion through the ERK signaling pathway in the human macrophage-like cell line, THP-1. *Cell Immunol* 2013;281:122-8.
327. Heumann D, Lauener R, Ryffel B. The dual role of LBP and CD14 in response to Gram-negative bacteria or Gram-negative compounds. *J Endotoxin Res* 2003;9:381-4.
328. Finberg RW, Re F, Popova L, Golenbock DT, Kurt-Jones EA. Cell activation by Toll-like receptors: role of LBP and CD14. *J Endotoxin Res* 2004;10:413-8.
329. Kim SJ, Kim HM. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. *BMB Rep* 2017;50:55-7.
330. Muller M, Scheel O, Lindner B, Gutschmann T, Seydel U. The role of membrane-bound LBP, endotoxin aggregates, and the MaxiK channel in LPS-induced cell activation. *J Endotoxin Res* 2003;9:181-6.
331. Gutschmann T, Muller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun* 2001;69:6942-50.
332. Minter RM, Bi X, Ben-Josef G, et al. LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury and mortality in the setting of biliary obstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G45-54.
333. Cohn JS. Postprandial lipemia and remnant lipoproteins. *Clin Lab Med* 2006;26:773-86.
334. Vigna GB, Donega P, Passaro A, et al. Post-prandial effects of gemfibrozil vs simvastatin in hypercholesterolemic subjects with borderline hypertriglyceridemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1999;9:234-43.
335. Castro Cabezas M. Postprandial lipaemia in familial combined hyperlipidaemia. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1090-3.

336. Lairon D, Lopez-Miranda J, Williams C. Methodology for studying postprandial lipid metabolism. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:1145-61.
337. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 2007;298:309-16.
338. Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Moreno JA, Gomez P, Perez-Jimenez F. Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:132-8.
339. Cardona F, Morcillo S, Gonzalo-Marin M, Tinahones FJ. The apolipoprotein E genotype predicts postprandial hypertriglyceridemia in patients with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2972-5.
340. van Oostrom AJ, van Wijk J, Cabezas MC. Lipaemia, inflammation and atherosclerosis: novel opportunities in the understanding and treatment of atherosclerosis. *Drugs* 2004;64 Suppl 2:19-41.
341. Graner M, Kahri J, Nakano T, et al. Impact of postprandial lipaemia on low-density lipoprotein (LDL) size and oxidized LDL in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 2006;36:764-70.
342. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1455-60.
343. Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, et al. Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clin Sci (Lond)*;119:251-61.
344. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1997;79:350-4.
345. Perez-Martinez P, Moreno-Conde M, Cruz-Teno C, et al. Dietary fat differentially influences regulatory endothelial function during the postprandial state in patients with metabolic syndrome: from the LIPGENE study. *Atherosclerosis*;209:533-8.
346. Roche HM, Zampelas A, Knapper JM, et al. Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism. *The American journal of clinical nutrition* 1998;68:552-60.
347. Silva KD, Kelly CN, Jones AE, et al. Chylomicron particle size and number, factor VII activation and dietary monounsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 2003;166:73-84.
348. Ruano J, Lopez-Miranda J, de la Torre R, et al. Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients. *Am J Clin Nutr* 2007;86:341-6.
349. Esposito K, Nappo F, Marfella R, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002;106:2067-72.
350. Fulop T, Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. *Pathologie-biologie* 2006;54:375-86.
351. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease and prevention in clinical practice. *Atherosclerosis* 2003;171:145-55.
352. Esposito K, Ceriello A, Giugliano D. Diet and the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 2007;5:291-6.
353. Schroder H. Protective mechanisms of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes. *J Nutr Biochem* 2007;18:149-60.
354. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, et al. The metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2008;29:777-822.
355. Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sanchez E, et al. A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J Am Coll Nutr* 2007;26:434-44.
356. Yang ZH, Miyahara H, Iwasaki Y, Takeo J, Katayama M. Dietary supplementation with long-chain monounsaturated fatty acids attenuates obesity-related metabolic dysfunction and

increases expression of PPAR gamma in adipose tissue in type 2 diabetic KK-Ay mice. *Nutr Metab (Lond)* 2013;10:16.

357. Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 2008;454:470-7.

358. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 2004;292:1440-6.

359. Miller M, Beach V, Sorkin JD, et al. Comparative effects of three popular diets on lipids, endothelial function, and C-reactive protein during weight maintenance. *J Am Diet Assoc* 2009;109:713-7.

360. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 2009;91:791-5.

361. Yan Y, Jiang W, Spinetti T, et al. Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 2013;38:1154-63.

362. Tierney AC, McMonagle J, Shaw DI, et al. Effects of dietary fat modification on insulin sensitivity and on other risk factors of the metabolic syndrome--LIPGENE: a European randomized dietary intervention study. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:800-9.

363. Camargo A, Rangel-Zuniga OA, Pena-Orihuela P, et al. Postprandial changes in the proteome are modulated by dietary fat in patients with metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2013;24:318-24.

364. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis* 2015;6:109-20.

365. Dominguez LJ, Barbagallo M. The biology of the metabolic syndrome and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016;19:5-11.

366. Anderson RM, Weindruch R. The caloric restriction paradigm: implications for healthy human aging. *Am J Hum Biol* 2012;24:101-6.

367. Howcroft TK, Campisi J, Louis GB, et al. The role of inflammation in age-related disease. *Aging (Albany NY)* 2013;5:84-93.

368. Ortiz Arduan A. [Aging and inflammation: Klotho, diet and the kidney connection]. *An R Acad Nac Med (Madr)* 2012;129:231-42; discussion 42-4.

369. Nettleton JA, Steffen LM, Mayer-Davis EJ, et al. Dietary patterns are associated with biochemical markers of inflammation and endothelial activation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr* 2006;83:1369-79.

370. Camargo A, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, et al. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. *The British journal of nutrition* 2012;108:500-8.

371. Yubero-Serrano EM, Gonzalez-Guardia L, Rangel-Zuniga O, et al. Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 modifies the expression of proinflammatory and endoplasmic reticulum stress-related genes in elderly men and women. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2012;67:3-10.

372. Diamanti-Kandarakis E, Papalou O, Kandaraki EA, Kassi G. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Nutrition as a mediator of oxidative stress in metabolic and reproductive disorders in women. *Eur J Endocrinol* 2017;176:R79-R99.

373. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552:335-44.

374. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 1996;25:57-74.

375. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005;135:969-72.

376. Castro-Quezada I, Roman-Vinas B, Serra-Majem L. The Mediterranean diet and nutritional adequacy: a review. *Nutrients* 2014;6:231-48.

377. Domenech M, Roman P, Lapetra J, et al. Mediterranean diet reduces 24-hour ambulatory blood pressure, blood glucose, and lipids: one-year randomized, clinical trial. *Hypertension* 2014;64:69-76.
378. Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, Giugliano D, Goudevenos JA, Panagiotakos DB. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1299-313.
379. Sureda A, Bibiloni MD, Martorell M, et al. Mediterranean diets supplemented with virgin olive oil and nuts enhance plasmatic antioxidant capabilities and decrease xanthine oxidase activity in people with metabolic syndrome: The PREDIMED study. *Mol Nutr Food Res* 2016;60:2654-64.
380. Pena-Orihuela P, Camargo A, Rangel-Zuniga OA, et al. Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients. *J Nutr Biochem* 2013;24:1717-23.
381. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, et al. Pleiotropic effects of TCF7L2 gene variants and its modulation in the metabolic syndrome: from the LIPGENE study. *Atherosclerosis* 2011;214:110-6.
382. Sun X, Komatsu T, Lim J, et al. Nutrient-dependent requirement for SOD1 in lifespan extension by protein restriction in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 2012;11:783-93.
383. Yubero-Serrano EM, Delgado-Casado N, Delgado-Lista J, et al. Postprandial antioxidant effect of the Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 in elderly men and women. *Age* 2011;33:579-90.
384. Wang C, Wheeler CT, Alberico T, et al. The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster*. *Age (Dordr)* 2013;35:69-81.
385. Meza-Miranda ER, Camargo A, Rangel-Zuniga OA, et al. Postprandial oxidative stress is modulated by dietary fat in adipose tissue from elderly people. *Age (Dordr)* 2014;36:507-17.
386. Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, et al. Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clinical science* 2010;119:251-61.
387. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care* 2009;32:2281-7.
388. Lyte JM, Gabler NK, Hollis JH. Postprandial serum endotoxin in healthy humans is modulated by dietary fat in a randomized, controlled, cross-over study. *Lipids Health Dis* 2016;15:186.
389. Camargo A, Rangel-Zuniga OA, Haro C, et al. Olive oil phenolic compounds decrease the postprandial inflammatory response by reducing postprandial plasma lipopolysaccharide levels. *Food chemistry* 2014;162:161-71.
390. Kaliannan K, Wang B, Li XY, Kim KJ, Kang JX. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci Rep* 2015;5:11276.
391. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001;44:129-46.
392. Hudson BI, Dong C, Gardener H, et al. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end-products and metabolic syndrome: the Northern Manhattan Study. *Metabolism* 2014;63:1125-30.
393. Suehiro A, Uchida K, Nakanishi M, Wakabayashi I. Measurement of urinary advanced glycation end-products (AGEs) using a fluorescence assay for metabolic syndrome-related screening tests. *Diabetes Metab Syndr* 2016;10:S110-3.
394. West RK, Moshier E, Lubitz I, et al. Dietary advanced glycation end products are associated with decline in memory in young elderly. *Mech Ageing Dev* 2014;140:10-2.

395. Prasad C, Imrhan V, Marotta F, Juma S, Vijayagopal P. Lifestyle and Advanced Glycation End Products (AGEs) Burden: Its Relevance to Healthy Aging. *Aging Dis* 2014;5:212-7.
396. Uribarri J, Cai W, Pyzik R, et al. Suppression of native defense mechanisms, SIRT1 and PPARgamma, by dietary glycoxidants precedes disease in adult humans; relevance to lifestyle-engendered chronic diseases. *Amino Acids* 2014;46:301-9.
397. Perrone L, Grant WB. Observational and ecological studies of dietary advanced glycation end products in national diets and Alzheimer's disease incidence and prevalence. *J Alzheimers Dis* 2015;45:965-79.
398. Van Puyvelde K, Mets T, Njemini R, Beyer I, Bautmans I. Effect of advanced glycation end product intake on inflammation and aging: a systematic review. *Nutr Rev* 2014;72:638-50.
399. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010;65:963-75.
400. Morris L, Bhatnagar D. The Mediterranean diet. *Curr Opin Lipidol* 2016;27:89-91.
401. Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, et al. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr* 2011;14:2274-84.
402. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, et al. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000;102:2284-99.
403. Perez-Jimenez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Molecular nutrition & food research* 2007;51:1199-208.
404. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348:2599-608.
405. Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Garcia-Rios A, Perez-Caballero AI, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. Mediterranean Diet and Cardiovascular Risk: Beyond Traditional Risk Factors. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;56:788-801.
406. Salas-Salvado J, Guasch-Ferre M, Lee CH, Estruch R, Clish CB, Ros E. Protective Effects of the Mediterranean Diet on Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome. *J Nutr* 2016.
407. Godos J, Zappala G, Bernardini S, Giambini I, Bes-Rastrollo M, Martinez-Gonzalez M. Adherence to the Mediterranean diet is inversely associated with metabolic syndrome occurrence: a meta-analysis of observational studies. *Int J Food Sci Nutr* 2017;68:138-48.
408. Ros E. The PREDIMED study. *Endocrinol Diabetes Nutr* 2017;64:63-6.
409. Babio N, Toledo E, Estruch R, et al. Mediterranean diets and metabolic syndrome status in the PREDIMED randomized trial. *CMAJ* 2014;186:E649-57.
410. Fito M, Estruch R, Salas-Salvado J, et al. Effect of the Mediterranean diet on heart failure biomarkers: a randomized sample from the PREDIMED trial. *Eur J Heart Fail* 2014;16:543-50.
411. Vasto S, Buscemi S, Barera A, Di Carlo M, Accardi G, Caruso C. Mediterranean diet and healthy ageing: a Sicilian perspective. *Gerontology* 2014;60:508-18.
412. Boccardi V, Esposito A, Rizzo MR, Marfella R, Barbieri M, Paolisso G. Mediterranean diet, telomere maintenance and health status among elderly. *PLoS One* 2013;8:e62781.
413. Gomez-Delgado F, Delgado-Lista J, Lopez-Moreno J, et al. Telomerase RNA Component Genetic Variants Interact With the Mediterranean Diet Modifying the Inflammatory Status and its Relationship With Aging: CORDIOPREV Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016.
414. Assmann KE, Adjibade M, Andreeva VA, Hercberg S, Galan P, Kesse-Guyot E. Association Between Adherence to the Mediterranean Diet at Midlife and Healthy Aging in a Cohort of French Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017.
415. Phillips CM, Goumidi L, Bertrais S, et al. Gene-nutrient interactions with dietary fat modulate the association between genetic variation of the ACSL1 gene and metabolic syndrome. *J Lipid Res* 2006;51:1793-800.
416. Uribarri J, Cai W, Woodward M, et al. ELEVATED SERUM ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS IN OBESE INDICATE RISK FOR THE METABOLIC SYNDROME: A link between

Healthy and Unhealthy Obesity? The Journal of clinical endocrinology and metabolism
2015;jc20143925.